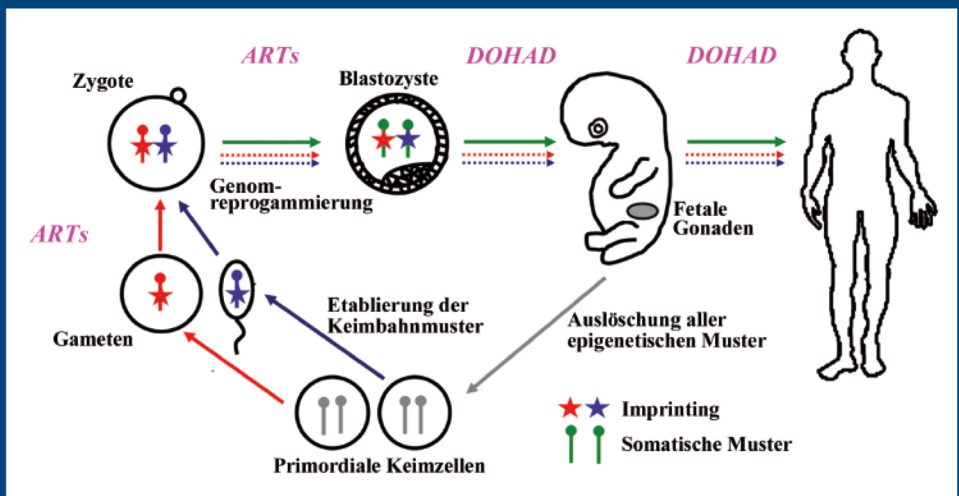


NOVA ACTA LEOPOLDINA

Neue Folge | Band 119 | Nummer 404

Geschlechtsabhängige Vererbung – mehr als Gender und Sex

Gottfried Brem (Hrsg.)



Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2016

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Geschlechtsabhängige Vererbung – mehr als Gender und Sex

NOVA ACTA LEOPOLDINA

Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Herausgegeben von Jörg HACKER, Präsident der Akademie

NEUE FOLGE

NUMMER 404

BAND 119

Geschlechtsabhängige Vererbung – mehr als Gender und Sex

Gemeinsames Symposium der
Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina –
Nationale Akademie der Wissenschaften, der
Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW)
und der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

am 27. und 28. März 2014 in Wien

Wissenschaftliche Vorbereitung und Organisation:
Gottfried BREM (Wien)
Mitglied der Leopoldina, wirkliches Mitglied der ÖAW



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2016
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart**

Redaktion: Dr. Michael KAASCH und Dr. Joachim KAASCH

Die Schriftenreihe Nova Acta Leopoldina erscheint bei der Wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft Stuttgart, Birkenwaldstraße 44, 70191 Stuttgart, Bundesrepublik Deutschland.

Die Schriftenreihe wird gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie das Ministerium für Wirtschaft, Wissenschaft und Digitalisierung des Landes Sachsen-Anhalt.

Einbandbild:

Epigenetischer Reprogrammierungszyklus. In der fetalen Keimbahn werden alle DNA-Methylierungsmuster komplett gelöscht (graue Symbole) und in der Gametogenese paternale (blau) oder maternale (rot) DNA-Methylierungsmuster etabliert. Die zwei Keimbahn-Epigenome, die bei der Befruchtung kombiniert werden, machen im frühen Embryo eine elternspezifische Reprogrammierung durch, bei der die meisten Keimbahnmuster wieder gelöscht und durch somatische Muster (grün) ersetzt werden. Nur die geprägten Gene behalten ihre Keimbahnmuster während der Entwicklung des neuen Organismus bei. Assistierte Reproduktionstechniken (ARTs), die in sensitiven Phasen der späten Keimzellentwicklung und frühen Embryogenese einwirken, können die Genomreprogrammierung beeinflussen. Nach der „Developmental Origins of Health and Disease (DOHAD)“-Hypothese können auch ungünstige Umweltfaktoren, die in der frühen Entwicklung auf das Individuum einwirken, Krankheitsrisiken für das spätere Leben programmieren. Siehe Beitrag HAAF S. 139–153, insbesondere S. 143. Mit freundlicher Genehmigung des Autors.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <https://portal.dnb.de> abrufbar.

Die Abkürzung ML hinter dem Namen der Autoren steht für Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften. Die Abkürzungen wM ÖAW und kMA ÖAW stehen für wirkliches Mitglied bzw. korrespondierendes Mitglied im Ausland der Österreichischen Akademie der Wissenschaften.

© 2016 Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e. V. – Nationale Akademie der Wissenschaften

Postadresse: Jägerberg 1, 06108 Halle (Saale), Postfachadresse: 110543, 06019 Halle (Saale)

Hausadresse der Redaktion: Emil-Abderhalden-Straße 37, 06108 Halle (Saale)

Tel.: +49 345 47239134, Fax: +49 345 47239139

Herausgeber: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg HACKER, Präsident der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften

Printed in Germany 2016

Gesamtherstellung: Elbedruckerei Wittenberg

ISBN: 978-3-8047-3415-9

ISSN: 0369-5034

Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier.

Inhalt

BRASSEUR, Georg: Vorwort	7
PARTHIER, Benno: Begrüßung	9
BREM, Gottfried: Einleitung. Biologische und sprachliche Differenzierung: Genus, Geschlecht, Sex und Gender	11

I. X-chromosomale Vererbung

STEINGRÄBER, Lilith, und BREINIG, Bertram: Hämophilie A und B beim Hovawart	23
LEEB, Tosso: X-chromosomal vererbte ektodermale Dysplasien bei Haustieren	39

II. Mitochondriale extrachromosomale Vererbung

DOVC, Peter, OGOREVC, Jernej, MILOŠEVIĆ BERLIČ, Tamara, JIANG, Zhihua, und KUNEJ, Tanja: Genetische Regulation der mitochondrialen Biosynthese	49
SWALVE, Hermann H., und WENSCH-DORENDORF, Monika: Statistische Methoden zur Modellierung mitochondrialer extrachromosomaler Vererbung über mütterliche Linien in Daten aus der Milchrinderzucht	59
SÖLKNER, Johann, PEREZ O'BRIEN, Ana M., HÖLLER, Daniela, BOISON, Solomon A., MILANESI, Marco, BOMBA, Lorenzo, UTSUNOMIYA, Yuri T., CARVALHEIRO, Roberto, NEVES, Haroldo H. R., DA SILVA, Marcos V. B., VAN TASSELL, Curtis P., SONSTEGARD, Tad S., MÉSZÁROS, Gábor, AJMONE-MARSAN, Paolo, und GARCIA, Jose Fernando: Zebuines Kerngenom und taurine Mitochondrien: Admixture von Nelore, der größten brasilianischen Rinderrasse	69
DRUML, Thomas, SMETKO, Anamarija, CURIK, Ino, KOSTELIĆ, Antun, BOKOR, Arpad, und ČUBRIĆ-ČURIK, Vlatka: MtDNA-Variabilität beim Noriker und Murinsulaner – Beispiele einer komplexen historischen Entwicklung in der Pferdezucht	77

III. Geschlechtsbegrenzte Vererbung

SIMIANER, Henner, OBER, Ulrike, HUANG, Wen, und MACKAY, Trudy: Hinweise auf eine geschlechtsdifferenzierte genetische Architektur für ein komplexes Fitnessmerkmal bei <i>Drosophila melanogaster</i>	91
---	----

WESSELS, Stephan, LÜHMANN, Liane Magdalena, KRAUSE, Ina, SHARIFI, Ahmad Reza, RUEANGSRI, Sawichaya, BECK, Julia, SCHÜTZ, Ekkehard, HÖRSTGEN-SCHWARK, Gabriele, und KNORR, Christoph: Geschlechtsdetermination bei der Fischart Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>): Von familienbasierten QTL-Studien, über Kandidatengene hin zu genomweiten Ansätzen	99
KOSTJUNINA, Olga, ZINOVIEVA, Natalia, PLOBNER, Lutz, und BREM, Gottfried: Paternale Wirkung von IGF2-Gen-Varianten auf Produktionsmerkmale von Schweinerassen in Russland	113
KRADOLFER, David, PISTEK, Veronika L., und ULBRICH, Susanne E.: Geschlechtsspezifische maternale Effekte endokriner Disruptoren auf die postnatale Entwicklung	121

IV. Geschlechtsabhängige Epigenetik

HAAF, Thomas: Elternspezifische Genomreprogrammierung in der Keimbahn und im frühen Embryo: Konsequenzen für die Entwicklung und das spätere Leben	139
BROCKMANN, Gudrun A., und KÄRST, Stefan: Genetisches Imprinting für Muskelmasse und Fettansatz bei der Maus	155
WOLF, Eckhard, GRAF, Alexander, KREBS, Stefan, ZAKHARTCHENKO, Valeri, und BLUM, Helmut: Neue Einblicke in die embryonale Genomaktivierung durch Allel-spezifische Genexpressionsanalysen	165
REINSCH, Norbert: Bedeutung der genomischen Prägung für landwirtschaftlich wichtige Eigenschaften bei Rind und Schwein	179

Vorwort

Georg BRASSEUR, wM ÖAW (Wien, Österreich)

Präsident der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse
der Österreichischen Akademie der Wissenschaften

Am 27. und 28. März 2014 fand das gemeinsam von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, der Österreichischen Akademie der Wissenschaften und der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführte Symposium „Geschlechtsabhängige Vererbung – mehr als Gender und Sex“ im Festsaal der alten Universität statt. Geschlechtsabhängige Vererbung umfasst genetische Effekte, die weit über Geschlecht und Gender hinausgehen und deshalb in der Humangenetik und Tierzucht auf besonderes Interesse stoßen.

Unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Gottfried BREM, einem international anerkannten Genetiker, präsentierten 18 Wissenschaftler aus fünf Nationen in vier Sitzungen zu den Themengebieten „X- und Y-chromosomale Vererbung“, „mitochondriale extrachromosomale Vererbung“, „geschlechtsbegrenzte Vererbung“ und „geschlechtsabhängige Epigenetik“ die Besonderheiten der geschlechtsabhängigen Vererbung.

Man diskutierte, welche Konsequenzen aus diesen, von der klassischen Vorstellung genetischer Prinzipien abweichenden Erbgängen, resultieren können. Die wissenschaftlich aktuellen Themen des Symposiums haben neben facheinschlägigen Wissenschaftlern und der interessierten Öffentlichkeit auch eine große Anzahl an diskussionsfreudigen Studenten angezogen. Daraus resultierten spannende Diskussionen nach den Vorträgen und in den Pausen zwischen den Sektionen.

Als Elektrotechniker und damit Laie auf dem Gebiet der Genetik und Vererbung erspare ich Ihnen eine dilettantische Zusammenfassung der fachlichen Highlights des zentralen Symposiumsthemas „Geschlechtsabhängige Vererbung“, ich erlaube mir aber zum Untertitel „mehr als Gender und Sex“ ein paar Bemerkungen zu machen.

Herr BREM widmet seine Einleitung dem Thema Frauen und ihre Gleichberechtigung, ein Thema, auf das seit den 1980er Jahren auch so manche Berufspolitiker setzten, die nicht mehr für Überzeugungen stehen, sondern die Machterhaltung *per se* zum Primat gemacht haben. Das Thema erscheint ihnen geeignet, Stimmen zu erhalten und zu gewinnen. Der billigste Weg, die Gleichberechtigung oberflächlich, aber öffentlichkeitswirksam vorwärts zu treiben, ist, den Unterschied zwischen Geschlecht, Genus (dem „grammatische Geschlecht“), Sex und Gender zu ignorieren.

An Hand von Beispielen präsentierte Herr BREM, wie die feministische Linguistik wegen einer vermeintlichen Bevorzugung der Männer und der quasi „Unsichtbarmachung“ der Frauen die Asymmetrie der Geschlechter im Bereich von Personenbezeichnungen kritisiert. Der Preis, den Frauen dafür zu zahlen haben, sind „Quotenfrauen“, und der Preis, den wir alle zahlen, ist der Versuch der politisch unterstützten „Vergeschlechtlichung“ der deutschen Sprache.

In der deutschen Sprache hat der Artikel inhaltlich nichts mit dem biologischen Geschlecht zu tun. Die drei Genera klassifizieren lediglich das lexikalisch festgelegte „grammatische Geschlecht“ von Substantiven und nicht das biologische. Im Deutschen wird ein Oberbegriff in Form eines Generikums benutzt, also beispielsweise der Hund, ein generisches Maskulinum, die Katze, ein generisches Femininum, oder das Pferd, ein generisches Neutrum.

Biologisch bezeichnet das grammatische Geschlecht beide sexuellen Ausprägungen. Im Tierreich meint der Adler, der Hase oder der Igel genauso beide Geschlechter wie die Ratte, die Eidechse oder die Maus. Immer sind beide Geschlechter gemeint.

Mit der „Vergeschlechtlichung“ der Sprache wird der Sexismus nicht entfernt. Aus dem Unrecht des vermeintlichen Vorranges des Mannes durch eine sprachliche Bevorzugung der Frau resultiert nicht Gerechtigkeit, sondern neues, anderes Unrecht. Selbst **der** Mensch ist dem Feministen suspekt, zumal er vom Begriff Mann ableitbar ist. Zur „Entmannung der Sprache“ wurde die Bezeichnung Studentin parallel zum Student eingeführt. Sprachfeminismus macht auch aus christlichen Wahrheiten wie „Liebe deinen Nächsten“ sprachliche Ungetüme wie „Liebe deinen Nächsten, deine Nächste und dein Nächstes“.

Ich wünsche Ihnen viel Vergnügen beim Lesen der kurzweiligen Einleitung, die entwaffnend aufzeigt, wie „zuviel des Guten“ eine grundsätzlich vernünftige Idee *ad absurdum* führen kann. Die der Einleitung folgenden wissenschaftlichen Vorträge des Symposiums werden weniger durch pointierten Humor, sondern durch gewichtige wissenschaftliche Inhalte überzeugen.

O. Univ.-Prof. Dr. Georg BRASSEUR, wM ÖAW
Präsident der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse
der Österreichischen Akademie der Wissenschaften
Dr. Ignaz Seipel-Platz 2
A-1010 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 515811205
Fax: +43 1 515811211
E-Mail: georg.brasseur@oeaw.ac.at

Begrüßung

Benno PARTHIER ML (Halle/Saale)

Altpräsident der Leopoldina

Sehr verehrte Damen und Herren,

es ist mir eine akademisch-leopoldinische Ehre und als Altpräsident eine persönliche Freude, Sie zu einem genetisch ausgerichteten veterinärmedizinischen Symposium zu begrüßen, das gemeinsam von der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, der Veterinärmedizinischen Universität Wien und der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina organisiert und durchgeführt wird.

Ich grüße Sie im Namen der Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina – so lautet nämlich die offizielle Bezeichnung seit dem 14. Juli 2008, als die ehemalige Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina zur Nationalen Akademie erhöht wurde. Vor allem möchte ich die herzlichen Grüße und guten Wünsche vom Präsidenten Jörg HACKER überbringen. Er ist zeitlich leider verhindert und bedauert deshalb, nicht dabei sein zu können. Die Vielfalt der Aufgaben im höchsten Amt der Akademie und deren Verantwortung und Erledigung, sowohl lokal im denkmalgeschützten „Weißen Haus“ in Halle als auch an vielen anderen Orten, ist enorm gestiegen, nachdem die Ernennung der Institution in den Nationalstatus stattgefunden hat.

Aus der früheren Stellung und den Aktivitäten der Deutschen Naturforscher-Akademie Leopoldina, die 1652 von Schweinfurter Ärzten als *Academia Naturae Curiosorum* gegründet, 1677 durch Kaiser LEOPOLD I. zur Reichsakademie erhoben wurde, entwickelte sich in den folgenden Jahrhunderten eine Gelehrtenengesellschaft von internationalem Rang in den deutschsprachigen Ländern. Ihre wissenschaftlichen Aufgaben fand sie in den naturwissenschaftlichen und medizinischen Sektionen. Die geisteswissenschaftlichen Fächer waren nicht vertreten, was sich in der Zeit der DDR und deren staatspolitischen Überwachung der Akademie als Vorteil erwies.

In unserem jetzigen Zeitalter der Globalisierung erfordern jedoch Themen wie Klimawandel, Energiegewinnung, Ernährung, Gesundheit, Demografischer Wandel und anderes mehr eine ausweisbare Gesellschafts- und Politikberatung. Diese bedarf auch länderübergreifender Aufgaben für die Wissenschaft. Daher ist eine zentrale Aufgabe für die Nationale Akademie der Wissenschaften im Sinne einer Arbeitsakademie auch die Mitarbeit in internationalen Dachorganisationen in Form einer Beratung von Politik, Gesellschaft und Wirtschaft zu aktuellen wissenschaftlichen und wissenschaftspolitischen Fragen. – Die Nationalakademie hat zurzeit 1500 Ordentliche Mitglieder, wovon etwa 1000 im aktiven Status (d. h. jünger als 75 Jahre) sind. Sie gehören den vier Klassen (Naturwissenschaften, Lebenswissenschaften, Medizin, Geisteswissenschaften) sowie den 27 Fachsektionen an.

Mein besonderer Gruß und Dank gilt unserem lokalen Mitglied der Sektion Veterinärmedizin, Herrn Gottfried BREM. Mit seinen Ideen und organisatorischen Fähigkeiten hat er das Thema „Geschlechtsabhängige Vererbung“ ausgesucht und dessen wissenschaftliche Vorbereitung hauptsächlich und verantwortlich auf seine Schultern gelegt, die so breit sind, wie die Themen für die ausgesuchten Redner.

Es ist ein treffliches Thema für Zoologen und Veterinärmediziner im Allgemeinen und ein hochinteressantes und eventuell auch teilweise brisantes Feld in der Genetik und ihren Vererbungsseigenschaften. Besonders freuen wir uns, lieber Herr BREM, über Ihr lobenswertes Engagement und diesbezügliche Aktivität, uns wiederum nach Wien einzuladen. Ein solches Geschenk haben Sie uns bereits fünf Mal in Form von Leopoldina-Symposien beschert.

Im Mai 2001 trafen sich die Veterinärmediziner, um die Ursachen und Analysen spezifisch-neurologisch kranker Rinder zu untersuchen (Thema: „BSE – Wahnsinn und Wirklichkeit“). Im Juli 2005 wurde dieses Thema über den Rinderwahnsinn nochmals in einem Symposium unter dem Titel „BSE – Status quo und Quo vadis?“ abgerechnet. Für das Symposium im Juni 2006 waren die lieben Kühe thematisch nach wie vor gefragt, dieses Mal unter dem Thema „BVD – eine (un)heimliche Rinderseuche“. Im März 2010, wurde die Genetik und Gentechnik zum Mittelpunkt des Themas „Das ‚gläserne‘ Tier: Ein- und Ausblicke in Genome und Gene von Haustieren“. Inhaltlich wurde damit bereits der heutige Titel vorgedacht: „Geschlechtsabhängige Vererbung – mehr als Gender und Sex“. Schließlich wurde im März 2013 das Thema „Erbfehler und Erbkrankheiten – ‚Ersünden‘ ohne Sündenfall?“ problematisiert.

Sie wollen es mir nachsehen, wenn ich als ehemaliger botanischer Biochemiker in einer hochspezialisierten Wissenschaftswelt die Wissensvielfalt der animalischen Genetik nicht überblicke, d. h. über ein Programm zur chromosomalen geschlechtsspezifischen Vererbung, zur geschlechtsbegrenzten Vererbung, zur extrachromosomalen Vererbung in Mitochondrien, und schließlich zur geschlechtsabhängigen Epigenetik nicht mitreden kann. – Ich weiß nicht, ob so viel junges Neues noch in ein altes Hirn hineinpasst.

Meine Damen und Herren: Nun darf ich auch mit Freude vorwegnehmen, dass die interessanten Themen dank Ihrer Ergebnisse in den Vorträgen und Illustrationen zu vielen neuen Erkenntnissen führen mögen und möchte allen Akteuren einen ertragreichen Verlauf des Symposiums wünschen.

Prof. Dr. Dr. h. c. Benno PARTHIER
Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina
Nationale Akademie der Wissenschaften
Jägerberg 1
06108 Halle (Saale)
Bundesrepublik Deutschland

Einleitung

Biologische und sprachliche Differenzierung: Genus, Geschlecht, Sex und Gender

Gottfried BREM ML, WM ÖAW (Wien, Österreich)

Geschlechtsabhängige Vererbung stößt, weil sie nicht den Mendelschen Regeln folgt und vom Geschlecht der Elterntiere beeinflusst wird, in der Genetik und Tierzucht auf besonderes Interesse. Von meinen Studenten verlange ich konsequent die Kenntnis der Mendelschen Regeln. Das ist nicht nur hier in Wien, wo MENDEL studiert hat, aber besonders hier, unabdingbar. Gegen die Klage der Studenten, dass sie diese Regeln nach der Schule und der Studien-Eingangsphase nun zum dritten Mal parat haben müssen, argumentiere ich, dass sie sich freuen können, in der Prüfung etwas zu wissen, was sie nicht mehr zu lernen brauchen. Und für diejenigen, die die Mendelschen Regeln immer noch nicht kennen, sei es allerhöchste Zeit, diese endlich zu verinnerlichen. Und ich freue mich dann, wenn ich von Kollegen höre, dass Studenten in höheren Semestern in Wien wenigstens die Mendelschen Regeln parat haben.

Bei den Ausnahmen von den Mendelschen Regeln bin ich großzügiger. Umso mehr freue ich mich heute, dass so viele Studenten der Einladung gefolgt sind zu einem Symposium, das sich diesen Ausnahmen widmet.

Vor der biologischen und sprachlichen Differenzierung von Genus, Geschlecht, Sex und Gender, eine historische Bemerkung vorweg: Die Einsicht, dass Männer und Frauen als sich fundamental voneinander unterscheidende Wesen zu betrachten sind, hat sich erst im 18. Jahrhundert entwickelt. Vorher war die Vorstellung, Männer und Frauen hätten ein Geschlecht, nicht ungewöhnlich. Die Lesart war, dass der Mann das Geschlecht halt außen habe und dass es bei der Frau nach innen gestülpt sei.

Bevor ich zur geschlechtsabhängigen Vererbung komme, will ich den gewählten Untertitel des heutigen Symposiums „mehr als Gender und Sex“ nicht unerläutert lassen. Als alter Mann kann ich hoffen, dass meine folgenden Ausführungen nicht als verunglückte Anmache missverstanden werden. Wünschenswert wäre ja nicht nur ein Symposium, sondern eine umfassende Veranstaltung über Frauen als großartigste Schöpfung Gottes überhaupt. Als Tierzüchter und Genetiker sah ich mich allerdings höchstens autorisiert, zum Thema geschlechtsabhängige Vererbung einzuladen. Aber die Freiheit einer Einleitung erlaubt mir, pointiert zu erklären, warum ich diesen Untertitel gewählt habe.

Trotz aller potentiellen Reproduktionstechniken sind wir – ohne Ausnahme – von einer Mutter geboren und die meisten von uns auch von ihr erzogen worden. Wir lernen von ihr (ohne formal unterrichtet zu werden) unsere Muttersprache, die eigentlich, ob der dadurch verinnerlichten grammatischen Grundstrukturen und Lautbildung meist ein – regionaler – Mutterdialekt ist. Trotz der biologischen und die kindliche Umwelt bestimmenden Bedeutung der Mutter geht dieser Einfluss – wohl während der Pubertät – stark zurück. Woran liegt es, dass vielen erwachsenen Männern nicht genügend bewusst bleibt, woher sie kommen. Ich

habe keine Antwort darauf und konnte bislang auch keine schlüssige Erklärung erfragen. Was sind die Gründe dafür, dass sich nach einer jüngst veröffentlichten Studie ein Drittel aller Frauen in Europa bereits gegen sie gerichteter körperlicher Gewalt und/oder sexueller Attacken ausgesetzt sahen? Eine im höchsten Maße erschreckende Bilanz.

Ich kenne und erkenne – wie viele andere – den Unterschied zwischen Geschlecht, Genus, Sex und Gender. Der Politik unterstelle ich, dass sie diese Unterschiede ignoriert. Worüber man sich nur dann wundert, wenn man nicht akzeptiert, dass viele heutige Berufspolitiker nicht mehr für Überzeugungen stehen, sondern die Machterhaltung zu ihrem Primat gemacht haben. Dazu setzen sie auf Themen. Themen, die ihnen geeignet erscheinen, Stimmen zu erhalten und zu gewinnen. Seit den 1980er Jahren waren Frauen und ihre Gleichberechtigung so ein Thema. Der Preis, den Frauen zu zahlen haben, sind „Quotenfrauen“, und der Preis, den wir alle zahlen, ist der Versuch der politisch unterstützten „Vergeschlechtlichung“ der Sprache.

Nur ein Wort zu den Quotenfrauen: Als die bayerische CSU vor einigen Jahren in einer Kampfabstimmung eine Quotenregelung installierte, waren es die jungen und selbstbewussten Frauen auf dem Parteitag, die sich bitter über diese Diskriminierung beschwerten. Geholfen hat es nichts, die Quotenregelung in der Partei wurde eingeführt. Bei den bayerischen Kommunalwahlen vor knapp zwei Wochen (16. 3. 2014) wurde in *keiner* der acht bayerischen Städte mit mehr als 100000 Einwohnern eine Frau zum Oberbürgermeister und nur in zwei von 71 Landkreisen eine Frau als Landrat gewählt. Und das, obwohl mehr als 50 % der Wähler Frauen sind.

Nun zum universitären Bereich. Was ist von der Torheit zu halten, dass ein Ministerium einem Rektor, noch nicht einmal der Universität, 100000 Euro Prämie als persönliche Entlohnung auslobt, wenn er eine Frau beruft? Wie fühlt sich Frau Professor, wenn sie davon erfährt? Ist so eine „Fangprämie“ nicht in hohem Masse diskriminierend, ja geradezu entwürdigend? Warum denkt Politik, dass so etwas vertretbar sei?

Ich genieße es, wenn, wie bei meinem letzten Flug geschehen, der Chefpurser, eine Frau, zur Vorbereitung des Abflugs sagt: „Ich begrüße Sie als Erster Offizier.“ Das ist, ohne *Offizierin*, korrektes Deutsch und drückt, ohne Wenn und Aber, gesundes Selbstverständnis aus.

Auch in ganz anderen Bereichen kommt es zu einer Art Entkrampfung. Auf Volksfesten und anderen Großveranstaltungen ist seit einigen Jahren zu beobachten, dass Frauen in Drangzeiten männliche Toiletten okkupieren, weil dort vor den Sitztoiletten keine Warteschlangen sind.

An einer technischen Universität sah ich kürzlich, direkt neben einer Damentoilette, einen Hinweis auf eine daneben lokalisierte „Unisex“-Toilette. Nach der ersten Verblüffung habe ich meine rudimentären Lateinkenntnisse zusammengekratzt. Unisex bedeutet direkt übersetzt: ein Geschlecht. Gemeint sind aber wohl beide Geschlechter ebenso wie Zwischenformen, bzw. dass alle gleich berechtigt dieses Etablissement benutzen dürfen. Also nicht mehr der, die, das oder ein Klo, sondern nur Klo.

Als Vater und Großvater bin ich – ohne tumbe Chromosomen-Arithmetik – über meine zwei Töchter und meine Enkeltochter genauso glücklich wie über meinen Sohn und meine zwei Enkelsöhne. Und ich ärgere mich sehr, wenn mir unterstellt wird, ich würde Frauen nicht gerecht, weil ich beispielsweise Studenten als Studenten anspreche und nicht als Studierende.

Neben dem Geschlecht, dem Sexus, gibt es das Genus, einen grammatikalischen *Terminus technicus*, abgeleitet vom lateinischen „Art, Gattung, Geschlecht“. Hier deshalb einige linguistische Anmerkungen zu Genus und Geschlecht. Wer mehr als Anmerkungen braucht, mag sich des zweieinhalbtausend Seiten starken Standardwerks zur Grammatik der deutschen Sprache bedienen (ZIFONUN et al. 1997).

Das „grammatische Geschlecht“ ist ein in vielen Sprachen vorkommendes Klassifikationsmerkmal von Substantiven. Viele *Substantive* wie Berufe, Nationalitäten, Religionen bezeichnen menschliche Gruppen. Die meisten dieser Personenbezeichnungen wurden durch das Anhängen einer Endung von einem Verb oder einem Substantiv abgeleitet. Sämtliche Funktionen, die von Verben abgeleitet wurden, sind aber trotz des maskulinen Genus natürlich nicht als biologisch männlich zu verstehen. Neben der gerade bei Berufsbezeichnungen häufigsten Endung „er“ gibt es noch eine Reihe anderer Endungen von Substantiven, die ebenfalls oft als „männliche“ Endungen interpretiert werden, da der grammatikalische Artikel der Personenbezeichnungen „männlich“ ist. Beispiele dafür sind der *Diplomand, Praktikant, Visionär, Kandidat, Biologe, Student, Prüfling, Doktor*. Alle diese Personenbezeichnungen sind zwar grammatisch „männlich“, werden aber traditionell für beide biologische Geschlechter verwendet und gelten selbstverständlich auch für Frauen. In der feministischen Linguistik – natürlich gibt es die – wird die Asymmetrie der Geschlechter im Bereich von Personenbezeichnungen wegen einer vermeintlichen Bevorzugung der Männer und der quasi Unsichtbarmachung der Frauen kritisiert. Feministen nehmen an den irrtümlich als „männlich“ eingestuften Personenbezeichnungen Anstoß und bestreiten einfach, dass Frauen durch diese Bezeichnungen mitgemeint seien.

Einen neuen Weg geht die zweitälteste Universität Deutschlands in Leipzig. Bei Diskussionen darüber, was sprachlich und politisch korrekt sei, also Herr Professor und Frau Professorin, ProfessorInnen oder Professor/Professorin, machte ein Mann den wohl ironisch gemeinten Vorschlag, ausschließlich die weibliche Form einzusetzen, also Professorin. Der Senat stimmte der Verwendung des generischen Femininums zu, so dass es in der Hochschulverfassung an der Universität Leipzig nun heißt: Herr Professorin. Der Artikel in der Süddeutschen Zeitung trug als Überschrift ein rektorales Zitat: „Wir waren nüchtern.“

Mit der „Vergeschlechtlichung“ der Sprache wird der Sexismus nicht entfernt, sondern erst recht eingeführt. Aus dem Unrecht des vermeintlichen Vorranges des Mannes durch eine sprachliche Bevorzugung der Frau resultiert nicht Gerechtigkeit, sondern neues, anderes Unrecht. Selbst *der Mensch* ist dem Feministen suspekt, zumal er vom Begriff *Mann* ableitbar ist. Zur „Entmannung der Sprache“ wurde die Bezeichnung *Studentin* parallel zum *Student* eingeführt. Sprachfeminismus macht auch aus christlichen Wahrheiten wie „Liebe deinen Nächsten“ sprachliche Ungetüme wie „Liebe deinen Nächsten, deine Nächste und dein Nächstes“.

Das grammatische Genus wird nicht nur geschlechtlich oder ungeschlechtlich, sondern auch übergeschlechtlich verwendet. Der Begriff des Genus ist streng gegen den Begriff des Sexus abzugrenzen. Im Deutschen folgt das Genus, also z. B. der Mann oder die Frau, des personenbezeichnenden Substantivs üblicherweise dem Sexus der bezeichneten Person. Der Artikel hat mit dem biologischen Geschlecht aber inhaltlich nichts zu tun. Die drei Genera klassifizieren lediglich das lexikalisch festgelegte „grammatische Geschlecht“ von Substantiven, nicht das biologische. Im Deutschen wird ein Oberbegriff in Form eines Generikums benutzt, also beispielsweise der Hund, ein generisches Maskulinum, die Katze, ein generisches Femininum, oder das Pferd, ein generisches Neutrum.

In der Linguistik wird das *generische Maskulinum*, also die grammatisch „männliche“ Form, als Oberbegriff für das aus Frauen und Männern bestehende Menschengeschlecht verwendet. Auf grammatikalischer Ebene kann das „männliche Geschlecht“ oder das „weibliche Geschlecht“ selbstverständlich nur sich selbst, aber nicht alle grammatischen „Geschlechter“ zugleich bezeichnen. Biologisch bezeichnet das grammatische Geschlecht beide sexuellen Ausprägungen. Im Tierreich meint *der Adler, der Hase* oder *der Igel* genauso beide Geschlechter wie *die Ratte, die Eidechse* oder *die Maus*. Immer sind beide Geschlechter gemeint.

Das „biologische Geschlecht“ von Lebewesen klassifiziert der Sexus. Auch allem Unge-
schlechtlichen ist ein Genus zugeordnet. Bei Substantiven wie Stuhl, Petersilie, Universität
usw. stellt sich also diese Frage nicht. Bei Substantiven, die Lebewesen bezeichnen, stellt
sich die Frage nach einem Zusammenhang zwischen den beiden Klassifikationen. Rind,
Amsel, Kind, Waise, Gast, Flüchtling, Person, Persönlichkeit, Individuum, Student etc. kön-
nen männlich und weiblich sein. Das ist sprachlich nicht diskriminierend. Ein Mensch, der
liest, ist ein Leser, einer der arbeitet, ist ein Arbeiter, ein Mensch der studiert, ist ein Stu-
dent.

Als die ersten Universitäten vor fast einem Jahrtausend entstanden, war die Sprache der
Wissenschaft Latein. Ein Student war damals ein *scholaris*, also ein Schüler. Daraus
entstanden auch die fahrenden Schüler, *scholares vagantes*, in heutiger Diktion verkrachte
Studenten. Im Mittelhochdeutschen gab es den – aus dem Lateinischen Partizip Präsens *stu-*
dens entlehnten – Ausdruck *studente*. In der Frühen Neuzeit wurde er zum *studiosus*, was
direkt übersetzt „der Eifrige, der Interessierte“ heißt. Dieser Studiosus oder auch *candidatus*
ist kein offizieller Titel, wird aber bis heute traditionell als eine Art studentischer Grad be-
nutzt. Im 20. Jahrhundert entstanden umgangssprachliche Bezeichnungen wie *Studiker* oder
auch *Studi*. *Studi* wird heute noch, wegen seiner Geschlechtsneutralität, gerne als schlanke
Kurzform verwendet. In den Nachkriegsjahren war im deutschen Sprachraum der Begriff
Student verbreitet. Aus dieser Sprachnorm sollten politisch gewollt *Studierende* werden, und
das wurde auf dem Verwaltungsweg geändert, präziser gesagt, durchgesetzt. Die Partizipi-
alform „Studierende“ ist aber sprachlich nicht zutreffend, wie gleich noch zu zeigen sein
wird.

Um zwischen dem biologischen und dem sozialen Geschlecht unterscheiden zu können,
hat sich vor einigen Jahrzehnten eingebürgert, für das soziale Geschlecht den aus dem Engli-
schen stammenden Begriff *Gender* zu verwenden. Während sich Sexus auf das biologische
Geschlecht bezieht, bezieht sich Gender auf das soziokulturelle Geschlecht. In Abwandlung
eines alten Zitats der französischen Schriftstellerin, Philosophin und Feministin Simone DE
BEAUVOIR, das ursprünglich für die Frau formuliert wurde, könnte man auch sagen: „Man
kommt nicht als Mann zur Welt, man wird es.“

Sprachlich falsch ist, etwas zu schreiben, was nicht sprechend vorgetragen werden kann.
Rede und Geschriebenes müssen Gesetzen der Verständlichkeit und der Ästhetik folgen. Wie
also mit dem Binnen-I umgehen? Es steht erstens im Widerspruch zur Orthographie und zwei-
tens führt das gesprochene Binnen-I zu der femininen Form „StudentInnen“, was die dort ei-
gentlich subsummierten männlichen Studenten definitiv ausschließt.

Manchmal erlangt sogar ein wissenschaftliches Symposium der ÖAW unerwartete zufäl-
lige politische Aktualität. Frau Walburg ERNST, die Vorsitzende des Normierungsinstitutes
Austrian Standards, hatte letzte Woche eine Empfehlung gegen das Binnen-I ausgesprochen
und im Interview gesagt: Sprache diene der „klaglosen Verständigung und nicht der Durch-
setzung zweifelhafter politischer Ziele“. Arbeiterkammer des Österreichischen Gewerkschafts-
bundes (ÖGB) und die Österreichische HochschülerInnenschaft (ÖH) protestierten heftig, das
ÖNORM-Institut zog den Kopf ein und ruderte kräftig zurück.

Wieder zu den Studenten. Andere Schreibweisen wie „Studenten/Studentinnen“, „Stu-
dent/-innen“, „Student(innen)“ erfordern beim Vortrag das Sprechen oder Betonen einer Klam-
mer, eines Schräg- oder Bindestriches. Die von der feministischen Linguistik empfohlene
Formulierung „Studentinnen und Studenten“ führt zur Frage, wie man einigermaßen elegant
die Schwerfälligkeit dieser umständlichen Doppelbezeichnungen überwindet.

Die schon erwähnte Verwendung des Aktiven Partizip Präsens, die im Maskulinum, Femininum und Neutrum gleich lautet, scheint sich deshalb als geschlechtsneutrale Form politisch korrekt zu eignen, sprachlich ist es nicht korrekt.

Statt von „Mitarbeitern“ wird heutzutage von „Mitarbeitenden“ gesprochen, „Lehrlinge“ werden zu „Lernenden“ und an die Stelle von „Studenten“ treten die „Studierenden“. Im Plural müsste es dann übrigens nicht „liebe Studierende“, sondern „liebe Studierenden“ heißen. „Studierende“ ist seit dem Inkrafttreten des Universitäts-Organisationsgesetzes 1993 (*UOG* 1993) der offizielle gesetzliche Terminus in Österreich. Es gibt auch keinen Studentenausweis mehr, sondern einen „Ausweis für Studierende“. Auch in Deutschland wird – motiviert durch „politische Korrektheit“ – die Bezeichnung „Studierende“ im offiziellen Sprachgebrauch benutzt, freilich ohne sich umgangssprachlich wirklich durchzusetzen. Hier ist der Zynismus, „Politiker sind zu allem fähig, aber zu fast nichts zu gebrauchen“, schwer zu entkräften.

Unberücksichtigt bleibt ohnehin, dass das Partizip Präsens eine momentane, abschließende Tätigkeit ausdrückt und bei der Verwendung Studierender grammatikalisch vermurkst wird. Ein Studierender ist – sprachlich korrekt – ein Mensch, der ein Buch, eine Abhandlung, eine Publikation oder etwas anderes vor sich hat und diese so vor sich hin studiert. Ein so Studierender muss aber nicht an einer Universität eingeschrieben sein. Immatrikulierter oder Immatrikulierte wäre also korrekter. Aber was wird aus diesen – meist jungen – Menschen, den Studierenden, wenn sie gerade nicht etwas studieren, wenn sie beispielsweise, so wie wir heute Abend, alle gemeinsam beim Heurigen sitzen und Wein trinken. Dann wären sie gemäß Partizip Präsens keine Studierenden und wir keine Lehrenden mehr, sondern allenfalls Weintrinkende und Aufstrichbrotessende. Ich glaube, das reicht jetzt: auf das grammatikalisch verwandte attributive Gerundiv will ich erschöpfungsbedingt nicht mehr eingehen.

Wer mich kennt, weiß, dass ich russophil bin. Ich war in den letzten 30 Jahren als ausländisches Mitglied der russischen Landwirtschaftsakademie fast hundertmal in Russland. Aus diesen Besuchen resultiert meine Einschätzung, dass Russland ein praktiziertes Matriarchat hat. Was gemacht wird, entscheiden die Frauen, in der Familie sowieso, aber auch in der großen Politik. Die Frauen in Russland sind sehr geschickt in der Umsetzung. Sie begeben sich praktisch nie selbst in hohe staatspolitische Ämter, sie schicken ihre Männer, und sie sagen ihnen, was sie tun müssen. Es ist in Russland ein offenes Geheimnis, dass GORBATSCHOV von Raissa, JELZIN von Naina und MEDWEDEV von Swetlana, also von ihren Ehefrauen geschickt und gesteuert wurden. Nur bei PUTIN ist das anders, da weiß man nicht, wer hinter ihm steht, weil er sich von Ljudmila getrennt hat. Vielleicht würde seine Politik sonst anders aussehen.

Die russische Sprache kennt keine Artikel wie die deutsche Sprache. Das Geschlecht eines Wortes wird durch diverse Endungen, die an Substantive angefügt werden, zum Ausdruck gebracht. Eine weibliche Endung ist beispielsweise „a“, gut ablesbar an weiblichen Vornamen, die meist auf „a“ enden, siehe die eben genannten Namen der Ehefrauen.

Für den Begriff Akademiker gibt es im Russischen sprachlich keine weibliche Form, genauso wenig wie für Genossen. Genossinnen werden nur im Deutschen so tituiert. Aber es gibt die Studentin oder die Professorin. Diese Formulierungen werden aber nur benutzt, wenn die angesprochene Gruppe ausschließlich aus Frauen besteht. Bei gemischten Gruppen verwenden die Russen immer die grammatikalisch männliche Form. Eine Anrede, wie liebe Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen, ist absolut ungebräuchlich und wird – auch von Frauen – nur im Scherz oder als Witz verwendet.

Nun von der linguistischen zur biologischen und gesellschaftlichen Realität. Und die biologische Realität ist: Männer haben's schwer, das relevante Geschlecht ist das der Frauen!

Frauen liefern mit der Oozyte und den darin enthaltenen RNAs und Proteinen nicht nur den größten Teil für den Start der individuellen Entwicklung, sie stellen auch sicher, dass sich ein Embryo und Fetus in wohlbehüteter Umgebung bis zur Geburt entwickeln kann. Erst danach, bei der Aufzucht, können Männer wieder etwas beitragen. Genetisch ist da längst alles gelaufen, die genetische Konstellation kann nur noch durch Umwelteinflüsse optimiert, beschädigt oder gegebenenfalls anschließend therapeutisch gemildert werden.

Männer haben es nicht deshalb schwer, weil das X-Chromosom des Menschen wesentlich größer ist und Frauen zwei davon haben. Auch Männer erben in der Regel ein X-Chromosom von ihrer Mutter. Das männliche Y-Chromosom, das vom Vater kommt, ist vergleichsweise windig, es enthält gerademal etwas mehr als dreißig Gene. Diese geschlechtsbestimmenden gonosomalen Gene auf dem Y-Chromosom sorgen ausschließlich dafür, soweit wir bislang wissen, dass es Männer überhaupt gibt. Neben dem Erhalt des eigenen Geschlechts hat ein Spermium zweierlei Funktionen: *Erstens* wird durch das Eindringen des Spermiums die Oozyte befruchtet und der Start für ein neu entstehendes Leben gesetzt. *Zweitens* komplettiert der beigesteuerte haploide paternale Chromosomensatz das maternale Genom zum diploiden Genom. Das ist nicht so trivial, wie es sich anhört. Durch Mikromanipulation von Kernen und Genomen konnten auch andere Konstellationen getestet werden. Was überhaupt nicht funktioniert, ist die Verdoppelung eines weiblichen haploiden Genoms. Auch durch Kombination von zwei verschiedenen haploiden weiblichen Genomen entsteht genauso wenig entwicklungsfähiges neues Leben wie aus zwei haploiden männlichen Genomen. Es braucht beides, ein weibliches und ein männliches Genom. Wenn artifiziell ein weibliches und ein männliches haploides Genom kombiniert werden, kann sich die so geformte Zygote zum Embryo und Fetus weiter entwickeln. Männer sind in der Reproduktion noch unverzichtbar. Wie lange das noch gelten mag, ist nicht sicher. In einer im Januar dieses Jahres in *Science* veröffentlichten Untersuchung wurde beschrieben, das bei Mäusen mittels assistierter Reproduktion Nachkommen generiert werden konnten, wenn das Y-Chromosom durch nur zwei Y-chromosomale Gene ersetzt worden war (YAMAUCHI et al. 2014).

Sicher aber ist, dass auch in Zukunft – so oder so – Frauen die Hauptlast der Reproduktion tragen. Und Fortpflanzung ist die Voraussetzung für Vererbung. Fortpflanzung ist, neben dem von der Umwelt abgegrenzten selbstregulierten Stoff- und Energiewechsel, der entscheidende Unterschied von Leben und unbelebter Materie. Nur die Fortpflanzung erlaubt Wachstum und Differenzierung. Kein Wunder also, dass sich auf dem Sektor Fortpflanzung evolutionär eine unglaubliche Vielfalt und Vielfältigkeit entwickelt hat. Wer sich dafür interessiert, dem seien auszugsweise zwei Bücher empfohlen: *Die Evolution im Liebesrausch – das bizarre Paarungsverhalten der Tiere* von Markus BENNEMANN und *Kamasutra kopfüber – die 77 originellsten Formen der Fortpflanzung* von Tobias NIEMANN. Sie lernen dabei viel Ergötzliches und Nützliches darüber, was sich die Evolution zu Liebe, Sex und Fortpflanzung hat einfallen lassen, u. a. über sexuelle Handlungen, spektakuläre Stellungen beim Geschlechtsakt, Prostitution, Heiratsschwindel und Geschlechtsumwandlungen – bei Tieren, das Meiste empfiehlt sich nicht zur Nachahmung.

Die Urform der Fortpflanzung war die ungeschlechtliche oder auch asexuelle Fortpflanzung. Nachkommen erhalten dabei ausschließlich eine identische Kopie der Erbanlagen von ihrem einen Elter. Das war und ist kein wirklich kreatives Geschehen, denn bei der ungeschlechtlichen Vermehrung entstehen die Nachkommen nicht aus Geschlechtszellen und – nebenbei bemerkt – ohne Rekombination, was allerdings die sich Fortpflanzenden selbst meist nicht besonders betrübt. Viele Pflanzen vermehren sich vegetativ, also durch Zerfall, Teilung oder Sprossung oder durch

Bildung von Sporen oder die Entwicklung von Embryonen ohne Befruchtung. Auch einige niedere Tiere bilden ihre Nachkommen durch mitotische Teilung oder Knospung.

Nicht zur ungeschlechtlichen Vermehrung gehört die Selbstbefruchtung, ebenfalls bei Pflanzen und auch bei Zwittern besonders beliebt. Die Nachkommen erhalten zwar hierbei auch nur Gene von einem Elter, aber, und das ist dem Genetiker wichtig, nach einer Rekombination. Die eingeschlechtliche Fortpflanzung gehört entweder zur ungeschlechtlichen Fortpflanzung, wenn bei der Apomixis die Nachkommen mit dem Elter genetisch identisch sind, oder zur geschlechtlichen Fortpflanzung, wenn die Automixis zu einer Vereinigung männlicher und weiblicher Gameten desselben zwitterigen Individuums führt.

Der Hauptvorteil der ungeschlechtlichen Vermehrung gegenüber der geschlechtlichen Fortpflanzung besteht darin, dass die Nachkommen durch das Fehlen von Rekombinationen weitestgehend genetisch identisch sind und vorteilhafte Genkombinationen dadurch erhalten bleiben. Außerdem entfällt bei ungeschlechtlicher Vermehrung und der Selbstbefruchtung die Zeit und Ressourcen verbrauchende Suche nach und zumindest partielle Bindung an Sexualpartner.

Der Nachteil der ungeschlechtlichen Vermehrung gegenüber der geschlechtlichen Fortpflanzung besteht darin, dass durch die fehlende Rekombination kein Austausch von Erbmaterial stattfindet, was die Neuentstehung vorteilhafter Neukombinationen von Erbanlagen unterbindet.

Bei der asexuellen Fortpflanzung erfolgt keine Differenzierung in verschiedene Geschlechter, so dass nur Mutationen zu Veränderungen der Erbanlagen führen können. Spannend ist die asexuelle Fortpflanzung bei Säugetieren, die sich im Prinzip ja gerne und ausgiebig der geschlechtlichen Fortpflanzung bedienen. Das faszinierende Phänomen monozygoter Zwillinge und Mehrlinge kennen wohl alle. Bei dieser Laune der Natur entstehen durch spontane Teilung aus einem frühen Embryo zwei oder mehrere entwicklungsfähige Fragmente (Polyembryonie), und das ist auch asexuelle Vermehrung.

Beim Neunbindengürteltier hat die Natur die partielle asexuelle Vermehrung zur Regel gemacht. Kurz nach der Nidation ruht der Embryo im Durchschnitt etwa vier Monate ohne Weiterentwicklung. Geboren wird dann regelmäßig eine geradzahlige Anzahl von genetisch identischen Nachkommen.

Vor einigen Jahrzehnten haben wir gelernt, bei Nutztieren monozygote Zwillinge artifiziell durch mikrochirurgische Manipulation von frühen Embryonalstadien zu generieren. In den 1990er Jahren entstanden dann durch das Klonen, erst von embryonalen und später auch von ausdifferenzierten Zellen adulter Tiere, die technologischen Voraussetzungen, um die asexuelle Fortpflanzung konsequent nutzen zu können.

In Bezug auf unser Thema nur so viel: Die weltweit erste geklonte Katze, die im Jahr 2001 geborene „Copycat“, sah nicht aus wie ein Klon der dreifarbigigen Kernspenderin. Ursache war die färbungsbestimmende Inaktivierung des X-Chromosoms, die zufällig erfolgt und deshalb auch bei Klonen unterschiedlich ist (BREM 2013).

Von der asexuellen ist die unisexuelle Fortpflanzung zu unterscheiden. Ich darf hier an die vorher erwähnte etwas fragwürdige Bezeichnung Unisex-Toilette erinnern. Bei der eingeschlechtlichen Fortpflanzung wird nur die Erbinformation eines Elters weitergegeben. Bei Parthenogenese entstehen die neuen Organismen aus unbefruchteten Eizellen des Muttertieres und entsprechen deshalb dem Erbgut der Mutter. Das wird gerne praktiziert von Pflanzen, Ameisen, Bienen und Blattläusen. Im Gegensatz zur bisexuellen Fortpflanzung entstehen bei der unisexuellen Fortpflanzung die Nachkommen allein aus weiblichen Keimzellen.

Bei zwittrigen Lebewesen kann es zur Autogamie oder Selbstbefruchtung kommen, wobei die Nachkommen aus befruchteten Eizellen entstehen. Die genetische Variation oder auch genetische Abweichung zum Elter ist durch die Mischung des Erbgutes der Großeltern fast so groß wie unter Vollgeschwistern bei geschlechtlicher Fortpflanzung.

Bei der geschlechtlichen oder sexuellen Fortpflanzung, die sich vor etwa 800 Millionen Jahren entwickelte, bilden die beiden Geschlechter weibliche und männliche Keimzellen, die bei der Befruchtung kombiniert werden. Da es von Generation zu Generation zu einer Rekombination der Erbanlagen kommt, erhöht sich die genetische Vielfalt innerhalb der Population enorm.

Bei Säugetieren ist das Geschlecht genetisch so festgelegt, dass männliche Individuen ein X- und ein Y-Chromosom, weibliche zwei X-Chromosomen haben. Das ist für Männer genetisch dann besonders nachteilig, wenn das im männlichen Genom vorhandene X-Chromosom einen Gendefekt trägt. Dieser kann nämlich nicht, wie bei Frauen, durch eine funktionelle Kopie auf dem anderen X-Chromosom, das nur in der Hälfte der weiblichen Zellen inaktiviert ist, kompensiert werden. Bekannte Beispiele X-chromosomaler Vererbung beim Menschen sind Bluterkrankheit, Duchenne-Muskeldystrophie oder Rot-Grün-Blindheit.

Bei geschlechtsabhängiger Vererbung sind entweder die Gene auf den Gonosomen, also den Geschlechtschromosomen, lokalisiert, oder die Expression autosomaler Gene wird vom Geschlecht beeinflusst. Gonosomale Gene werden als geschlechtsgekoppelt oder geschlechtsgebunden bezeichnet. Da auf dem X-Chromosom auch zahlreiche Gene liegen, die nichts mit der Geschlechtsentwicklung zu tun haben, wird geschlechtsgekoppelte Vererbung häufig mit X-chromosomaler Vererbung gleichgesetzt. Beim Menschen kennt man einige hundert Gene, die auf dem X-Chromosom lokalisiert sind und in mutierter Form Erbkrankheiten verursachen können.

Bei geschlechtsbegrenzter Vererbung prägen sich Merkmale ausschließlich bei einem Geschlecht aus, unabhängig davon, ob die Gene auf Gonosomen oder Autosomen lokalisiert sind. Erblichen mit relativer Geschlechtsbegrenzung werden meist multifaktoriell vererbt und sind beispielsweise die bei Frauen besonders häufige angeborene Hüftluxation oder die Glatzenbildung bei Männern.

In der Tierzucht ist die geschlechtsbegrenzte Vererbung, bei der die Wirkung von Genen auf nur ein Geschlecht begrenzt ist, von besonderer Bedeutung. Die einprägsamsten Beispiele sind die Milchleistung oder auch weibliche Fertilitätsmerkmale. So wird der Ertrag und die Zusammensetzung der Milch zur Hälfte vom männlichen Tier vererbt. Die in männlichen Individuen vorhandenen Gene kommen aber naheliegender Weise nur im weiblichen Geschlecht zur Ausprägung. Heutzutage nutzt die Leistungszucht die genomische Selektion, um frühzeitig väterliche Gene für weiblich begrenzte Merkmale potenzieller Töchter direkt aus der Genomsequenz bzw. den analysierten SNPs abzuleiten.

Auch die extrachromosomale Vererbung ist vom Geschlecht abhängig, da die mitochondriale DNA nur über die Eizelle von der Mutter und nicht über das Spermium des Vaters an die Nachkommen weitergegeben wird.

Ein zentrales Dogma der Molekularbiologie war die Ausschließlichkeit DNA-vermittelter Vererbung. Diesem Dogma widersprechen vererbte Veränderungen der Genexpression, die nicht auf Sequenzänderungen beruhen. Diese Komponente zwischen Genotyp und Umwelt gehört zum Genom, weil sie an der DNA fixiert ist, und sie wird von der Umwelt beeinflusst, weil sie auf Chromatinebene nach einem eigenen epigenetischen Code kontrolliert wird. Dieser epigenetische Code kann geschlechtsabhängig vererbt werden, wenn gametische Prägung durch die Keimbahn chromosomale Abschnitte so markiert, dass in somatischen Zellen die

beiden Allele eines Gens in Abhängigkeit davon, ob das Allel vom Vater oder der Mutter geerbt wurde, unterschiedlich aktiv sind. Dieses Phänomen wird *Imprinting* genannt. Neben *Imprinting* zählen auch *Gen-Silencing*, Positionseffekte, X-chromosomale Inaktivierung, maternale und paternale Effekte zu den epigenetischen Prozessen.

In einer schwedischen Studie (PEMBREY et al. 2006) wurden verschiedene Faktoren über die Lebensmittelverfügbarkeit und Sterbefälle in einer Kleinstadt untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Versorgung mit Nahrungsmitteln der Großväter väterlicherseits in Beziehung zum Mortalitätsrisiko der Enkelsöhne stand, während diejenige der väterlichen Großmütter mit derjenigen der Enkeltöchter assoziiert war. Dies wurde auf epigenetische Veränderungen der Geschlechtschromosomen zurückgeführt.

Abweichungen von den Mendelschen Vererbungsregeln sind neben der geschlechtsgekoppelten und geschlechtsbegrenzten, der mitochondrialen Vererbung und der genomischen Prägung auch polygene und multifaktorielle Vererbung und andere Effekte, die nicht geschlechtsabhängig sind.

Damit komme ich zum Ende meiner Ausführungen und wappne mich gegen die Frage, was denn nun mit dem Sex sei. Hier gestehe ich, dass ich einem überwiegend so jugendlichen Auditorium zur biologischen und sprachlichen Differenzierung des Begriffs *Sex* nichts Überraschendes zu sagen vermag. Obwohl das in der Heimatstadt Sigmund FREUDS schon einen gewissen eigenen Reiz hätte. Die fortgeschrittene Zeit drängt mich aber, zum Ende zu kommen, und so überlasse ich Sie beim Sex ihrem eigenen Nachsinnen und Überlegen.

Wir kommen nun zu den speziellen wissenschaftlichen Vorträgen des Symposiums, und ich freue mich auf die erste Sitzung, die freundlicherweise von Prof. STINGL von der ÖAW moderiert wird und dem ich jetzt gerne das Mikrofon übergebe.

Herzlichen Dank für Ihre Aufmerksamkeit.

Literatur

- BENNEMANN, M.: Die Evolution im Liebesrausch – das bizarre Paarungsverhalten der Tiere. Frankfurt (Main): Eichborn 2010
- BREM, G.: Brems *Nutztierleben*. An- und Einsichten eines Tierzüchters in der Tiermedizin. Wien: Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften 2013
- NIEMANN, T.: Kamasutra kopfüber – die 77 originellsten Formen der Fortpflanzung. München: C. H. Beck 2010
- PEMBREY, M. E., BYGREN, L. O., KAATI, G., EDVINSSON, S., NORTHSTONE, K., SJÖSTRÖM, M., GOLDING, J., and *The ALSPAC Study Team*: Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 159–166 (2006)
- YAMAUCHI, Y., RIEL, J. M., STOYTICHEVA, Z., and WARD, M. A.: Two Y genes can replace the entire Y chromosome for assisted reproduction in the mouse. *Science* 343, 69–72 (2014)
- ZIFONUN, G., HOFFMANN, L., STRECKER, B., and BALLWEG, J.: Grammatik der deutschen Sprache. Berlin u. a.: Walter de Gruyter 1997

Prof. DI. Dr. Dr. h. c. mult. Gottfried BREM
Institut für Tierzucht und Genetik
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250775600
Fax: +43 1 250775690
E-Mail: gottfried.brem@vetmeduni.ac.at

I. X-chromosomale Vererbung

Hämophilie A und B beim Hovawart

Lilith STEINGRÄBER und Bertram BREINIG ML (Göttingen)

Zusammenfassung

Die Hämophilien A und B sind Störungen der sekundären Hämostase, die auf quantitativen oder qualitativen Defekten der Faktoren VIII (Hämophilie A) und IX (Hämophilie B) beruhen. Anhand der äußerlichen Anzeichen sind die beiden Erkrankungen kaum zu unterscheiden. Die Ausprägung der Symptome ist bei beiden Erkrankungen abhängig von Grad und Art der Gerinnungsfaktorstörungen, denen zahlreiche verschiedene Mutationen zugrunde liegen. Beim Menschen wird anhand der verbleibenden Restfaktoraktivität von F VIII und F IX eine Einteilung nach Schweregraden vorgenommen: Für Faktor VIII liegt bei 1 % eine schwere, zwischen 1 % und 4 % eine mittelschwere und von 5 %–20/30 % eine milde Hämophilie vor. Bei Hämophilie B liegt die Faktor-IX-Aktivität bei den meisten beschriebenen Fällen < 2 %, kann jedoch bei Hunden mit weniger schweren Symptomen ca. 9 % betragen. Klassische Symptome einer Hämophilie wie Lahmheit, Schmerzen, Gelenkschwellungen aufgrund einer Hämarthrose treten bereits im Alter von sechs Wochen bis drei Monaten auf. Zusätzlich können durch subkutane Hämatoome umfangreiche Schwellungen in unterschiedlichen Körperregionen auftreten. In einigen Fällen fallen betroffene Hunde bereits direkt nach der Geburt durch lange anhaltende Blutungen aus der Nabelschnur auf. Beim Zahnwechsel oder nach chirurgischen Eingriffen kommt es zu anormal langen Blutungen oder Hämatoombildung. Hämatologische Befunde betreffen normale Blutungszeiten, extrem verlängerte Gerinnungszeiten, normale Thromboplastinzeiten sowie normale Fibrinogen- und Prothrombin-Gehalte im Plasma. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) ist in den meisten Fällen verlängert. Im Gegensatz zur Hämophilie A lässt sich die verlängerte aPTT bei Hämophilie B durch Zugabe von normalem Serum aufheben.

Bei den Hämophilien A und B handelt es sich um klassische geschlechtsgebundene X-chromosomale Erkrankungen, die durch unterschiedliche Mutationen in den Genen für den Faktor VIII (Cfa Xq28) und IX (Cfa Xq26.3-27.1) bedingt sind. Hämophilie A wurde bei mindestens 30 Hunderassen beschrieben und konnte auf molekularer Ebene u. a. beim Deutschen Schäferhund, Irish Setter, Golden Retriever und Miniatur Schnauzer aufgeklärt werden. Über Fälle von Hämophilie B wurde bisher bei mindestens 13 Hunderassen berichtet, und ursächliche Mutationen oder Strukturveränderungen im FIX-Gen wurden u. a. beim Lhasa Apso, Labrador Retriever, Rhodesian Ridgebacks, Deutsch Drahthaar, Pit Bull Terrier und Airedale Terrier identifiziert. Wir berichten über eine bisher nicht beschriebene FIX-Genvariante beim Hovawart.

Abstract

Hemophilia A and B are X-chromosomally inherited disorders resulting from quantitative or qualitative changes of either Factor VIII (hemophilia A) or IX (hemophilia B) activities. Clinical signs of both diseases are almost indistinguishable and depend on the degree and type of the clotting factor dysfunction. In human Factor VIII activities < 1 % result in a severe, between 1–4 % moderate and from 5–30 % mild hemophilia. In most hemophilia B cases reported so far, Factor IX activities were < 2 %, and only few cases with mild hemophilia B have been reported with approx. 9 % activity. Typical clinical signs of lameness, pain, joint swelling resulting from hemoarthrosis may already develop at an age of six weeks to three months. In addition severe swellings at different body locations can be observed resulting from subcutaneous hematoma. Hematological findings show normal bleeding times, extremely prolonged clotting, normal thromboplastin times as well as fibrinogen- and prothrombin levels in plasma. The activated partial thromboplastin time (aPTT) is usually prolonged. In contrast to hemophilia A prolonged aPTT can be restored by the addition of normal serum in hemophilia B.

Both hemophilias are classical X-linked disorders resulting from a variety of breed and family specific mutations of the corresponding *F8* and *F9* genes. Hemophilia A has been reported in at least 30 different dog breeds and has been elucidated on a molecular level e.g. in German Shepherd, Irish Setter, Golden Retriever, and Miniature Schnautzer. Cases of hemophilia B have been described in at least 13 different dog breeds including Lhasa Apso, Labrador Retriever, Rhodesian Ridgeback, German Wirehaired Pointer, Pit Bull and Airedale Terrier. We analysed cases of hemophilia A and B in families of Hovawarts and identified the causative mutations.

1. Einleitung

Bereits im 2. Jahrhundert nach Christus wurde das Krankheitsbild der Hämophilie im Talmud erwähnt. Hierin findet sich der erste Hinweis auf eine erblich bedingte Gerinnungsstörung: „Ein Junge, dessen zwei ältere Brüder an Blutungen infolge der rituellen Beschneidung verstorben sind, darf nicht beschnitten werden. Die gleiche Regel findet Anwendung, wenn zwei Schwestern (je) ihren Sohn durch die Folgeblutung einer Beschneidung verloren haben. Der dritten Schwester ist es dann verboten ihren Sohn beschnitten zu lassen.“¹

In Friedrich HOPFFS Dissertation *Über die Hämophilie oder die erbliche Neigung zu tödlichen Blutungen* aus dem Jahre 1828 tritt der Begriff „Hämophilie“ (= Liebe/Neigung zur Blutung) erstmalig auf (NILSSON 1994). Besondere Beachtung erlangte die erblich bedingte Krankheit durch die englische Königsfamilie im 19. Jahrhundert (LANNOY und HERMANS 2010). Durch häufige Vermählung innerhalb der Familie erkrankten überdurchschnittlich viele Angehörige der europäischen Königshäuser und Herrscherfamilien an Blutgerinnungsstörungen. Königin VICTORIA VON ENGLAND (1819–1901) gilt als erste bekannte Überträgerin (Konduktorin) der Hämophilie und vererbte sie an drei ihrer neun Kinder. 1853 wurde VICTORIAS achtens Kind, LEOPOLD („Duke of Albany“), geboren, der ebenfalls an der Bluterkrankheit litt und im Alter von 31 Jahren an einer Hirnblutung verstarb (KEEVIL 1954). Über seine beiden Schwestern, Alice VON HESSEN-DARMSTADT (1843–1878) und Beatrice VON BATTENBERG (1857–1944), verbreitete sich die Erbkrankheit auch über mehrere Generationen in den verschiedenen Herrscherhäusern Spaniens, Preußens und Russlands.

Friedrich Wilhelm VON HESSEN-DARMSTADT (1870–1873), ein hämophiler Sohn von Alice, erlag im Alter von drei Jahren nach einem Fenstersturz seinen Verletzungen. Irene VON HESSEN-DARMSTADT war – wie ihre Mutter Alice – Konduktorin. Ihre beiden Söhne Waldemar VON PREUSSEN (1889–1945) und Heinrich (1900–1904) verstarben an Hämophilie. Überträgerin der Bluterkrankheit war auch Alices zweite Tochter Alix VON HESSEN-DARMSTADT, die mit Zar NIKOLAUS II. VON RUSSLAND vier Mädchen und einen Jungen hatte. Der 1904 geborene Zarewitsch Alexej konnte aufgrund seiner Erkrankung die Zarenkrone nicht annehmen (ARONSON 2000).

Beatrice VON BATTENBERG brachte vier Kinder zur Welt. Sie hatte zwei Söhne, Leopold (1889–1922) und Maurice (1891–1914), die beide Bluter waren und bei einer Notoperation bzw. im Ersten Weltkrieg verstarben. Beatrices Tochter, Victoria VON BATTENBERG (1887–1969), wurde Mutter von sieben Kindern und vererbte an drei ihrer Söhne die Blutgerinnungsstörung. Alfonso VON BATTENBERG (1907–1938) verblutete 1938 nach einem Autounfall, sein Bruder Gonzalo VON BATTENBERG (1914–1934) erlag ebenfalls nach einem Autounfall seinen inneren Verletzungen, und Fernando wurde 1910 tot geboren (OJEDA-

1 ROSNER 1984, S. 900.

THIES und RODRIGUEZ-MERCHAN 2003). Rupert Fürst von TECK (1907–1928) verstarb als hämophiler Sohn von Alice („Countess of Athlone“) im Alter von 21 Jahren. Im Zuge umfassender Forschung konnte Hämophilie B als Ursache der „Königlichen Krankheit“ ermittelt werden.

Hämophilie A und B sind geschlechtsgebundene Blutgerinnungsstörungen, die X-chromosomal rezessiv vererbt werden. Hierbei fungieren heterozygote Frauen meist als Konduktorinnen (Überträgerinnen), indem sie ein X-Chromosom mit dem „Hämophilie-Gen“ an die nächste Generation weitergeben. Sie selbst erkranken nicht, sind meist asymptomatisch und bleiben mit verringerter Einzelfaktoraktivität klinisch unauffällig. Männer erkranken hingegen besonders oft an Hämophilie.

2. Physiologie und Pathologie der Hämostase

Die Hämostase (= Blutstillung) lässt sich in verschiedene Komponenten unterteilen: vaskuläre und thrombozytäre Komponenten sowie das plasmatische Gerinnungssystem (MISCHKE 1995).

Wird ein Blutgefäß verletzt, so muss der Blutstrom reguliert und die Blutgerinnung einsetzen. Initial erfolgt eine lokale Vasokonstriktion, und der Blutdruck sinkt im betroffenen Areal, wodurch ein weiterer Blutverlust vermieden wird (PAREDES und CHAN 2013). Im zweiten Schritt werden Blutplättchen aktiviert, lagern sich an freiliegende Kollagenfasern (unter dem Endothel des Gefäßschadens) an und bilden so durch Aggregation einen Thrombus. Dieser erste Plättchenpfropf ist locker und labil. Die Thrombozytenadhäsion wird durch den von Endothelzellen abgegebenen von-Willebrand-Faktor gesteuert (RUGGERI 1993). Vorübergehend ist der Gefäßschaden durch die Schritte der primären Hämostase verschlossen, für eine langfristige Blutstillung sind jedoch weitere Schritte des plasmatischen Gerinnungssystems erforderlich.

In der sekundären Hämostase spielen Gerinnungsfaktoren eine entscheidende Rolle. Als Endresultat der Kaskade wird Fibrin mit Hilfe von Thrombin (Faktor IIa) und Faktor XIIIa aus Fibrinogen (Faktor I) gebildet (ARNOUT et al. 2006, STASSEN et al. 2004). Es folgt die Vernetzung, Einlagerung und Verbindung der unlöslichen Fibrinfäden mit dem Endothel. Der labile Plättchenpfropf agglutiniertes Thrombozyten wird durch unlösliches Fibrin zum stabilen Thrombus verbunden. Blutplättchen und Fibrin bilden einen weißen Thrombus, unter Einbeziehung von Erythrozyten bildet sich ein roter Thrombus (MOSIER 2009). Durch bestimmte Koagulationsinhibitoren, z. B. Antithrombin III, wird einer überschießenden Gerinnung vorgebeugt. Nachdem die Blutung gestoppt und die Wundheilung begonnen hat, wird im letzten Schritt (Fibrinolyse) das Blutgerinnsel durch Plasmin abgebaut. Plasmin entsteht aus Plasminogen und spaltet Fibrin in Fibrinolyseprodukte. Im Verlauf der Wundheilung wird der Thrombus gegen Reparaturgewebe ausgetauscht.

3. Störung der Hämostase

Man unterscheidet zwischen angeborenen und erworbenen Blutungsleiden (LIPPI et al. 2012). Die klinischen Befunde lassen häufig schon eine erste Vermutung zu, ob es sich um eine Störung der primären oder sekundären Hämostase handelt. Spezifische Gerinnungsstörungen können jedoch nur durch Labortests (Gerinnungsprofil) ausgeschlossen werden (YIN und NOLTE

2007). Petechien, Epistaxis und Ekchymosen können auf einen Defekt im Bereich der Thrombozyten oder Gefäße hinweisen, große Hämatome und Einblutungen in die Körperhöhlen deuten eher auf eine Störung der plasmatischen Gerinnung hin.

Als häufigste Störung der primären Hämostase beim Hund ist die Thrombozytopenie zu nennen. Weitere Ursachen sind Thrombozytopathien (Funktionsstörung der Blutplättchen), Erkrankungen der Gefäße (Vasopathien) oder die von-Willebrand-Krankheit. Thrombozytopenie kann durch eine verminderte Produktion, erhöhten Umsatz und Verbrauch, Sequestration sowie eine vermehrte Zerstörung der Blutplättchen entstehen (ROSSOW und STAUFENBIEL 1995). Lymphoproliferative Erkrankungen (z. B. multiples Myelom), nichtsteroidale Antiphlogistika wie Acetylsalicylsäure (ASS), systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus und erbliche Erkrankungen können die Funktionsweise von Thrombozyten negativ beeinflussen (BALTZIS et al. 2014, KWAAN 1988). Erkrankungen der Blutgefäße sind bei Kleintieren selten (Ehlers-Danlos-Syndrom, feline Epitheliogenesis imperfecta, canine autoimmune Vasculitis) und lassen sich nur histologisch diagnostizieren (YIN und NOLTE 2007). Die erbliche von-Willebrand-Erkrankung lässt sich qualitativ und quantitativ nach den Multimeren in unterschiedliche Formen einteilen (FAVALORO et al. 2014). Manche Hunderassen besitzen eine Disposition für die von-Willebrand-Erkrankung und zeigen oft Typ I (quantitativer Mangel) (MISCHKE 2003). Durch die vielfältigen Funktionen des von-Willebrand-Faktor (vWF) wird einerseits die primäre Hämostase und andererseits das intrinsische System gestört.

Sekundäre Hämostasestörungen können angeboren oder erworben sein. Zu den hereditären Störungen zählen in erster Linie Hämophilie A und B, die durch einen Mangel der Blutgerinnungsfaktoren VIII (A) bzw. IX (B) verursacht werden. Als Hämophilie C wird ein Mangel von Faktor XI beschrieben. Sehr selten treten Mangelzustände der Faktoren II, V, VII, X, XII auf (PEYVANDI et al. 2012).

Die häufigste erworbene Defektkoagulopathie ist der Vitamin-K-Mangel, der durch Lebererkrankungen, eine Intoxikation mit einem Kumarinderivat, entzündliche Darmveränderungen, chronische Antibiotikatherapie, exokrine Pankreasinsuffizienz oder auch Neoplasien, wie das Lymphosarkom, entstehen kann (HARSHMAN et al. 2014, SAAD und DALLY 2015). Vitamin K ist fettlöslich und wird in der Leber gespeichert. Einige Gerinnungsfaktoren sind Vitamin-K-abhängig. Kommt es zu einem Mangel an Vitamin K, so werden die Faktoren II, VII, IX und X in ihrer Funktion beeinträchtigt und liegen als inaktive Vorstufen der Faktoren in der Leber vor (MISCHKE 2003). Kumarinderivate sind Mittel der Wahl bei der Nagerbekämpfung und werden oft unabsichtlich von Hunden oral aufgenommen. Kumarinderivate hemmen die Vitamin-K-Epoxidreduktase, wenig später kommt es zu einem Absinken der Konzentration der Vitamin-K-abhängigen Faktoren im Blut. Hierbei hat Faktor VII beim Hund die kürzeste Halbwertszeit (2–4 h) (YIN und NOLTE 2007). Bei Verdacht auf eine Kumarinintoxikation sollte immer ein Quicktest durchgeführt werden.

Als kombinierte primäre und sekundäre Hämostasestörung wird die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC, Verbrauchskoagulopathie) angesehen (VENUGOPAL 2014). Bei einer Vielzahl von primären Grunderkrankungen tritt sekundär eine DIC auf. Primäre Ursachen können z. B. entzündliche Erkrankungen, Neoplasien, hämolytische Anämien, obstetrische Störungen oder Vasculitis sein (YIN und NOLTE 2007, WADA et al. 2014). Nachfolgend kommt es zur Bildung von vielen, kleinen Thromben, Ischämie und einem überschießenden Verbrauch an Blutplättchen und Gerinnungsfaktoren. Die einsetzende reaktive Fibrinolyse führt zu einem gesteigerten Verbrauch an Inhibitoren der Gerinnung und letztendlich zur verstärkten Blutungsbereitschaft, die bis zum hypovolämischen Schock führen kann (ROSSOW und STAUFENBIEL 1995).

4. Diagnose und Therapie von Hämostasestörungen

4.1 Labordiagnose primärer Hämostasestörungen

Eine Bestimmung der Thrombozytenzahl sollte zu Beginn der Diagnostik erfolgen. Nach Vorbehandlung des EDTA-Blutes und Hämolyse können die Blutplättchen z. B. im Notfall direkt manuell in einer Zählkammer ausgezählt werden. Mit Ölimmersion (1000×) werden beim Hund 12–15 Blutplättchen im Blickfeld erwartet – hierbei steht ein Blutplättchen für etwa 12 000–15 000 Thrombozyten pro Mikroliter. Sinken die Werte unter 30 000 Thrombozyten/ μL ist die Gefahr von Blutungen sehr hoch, und es besteht eine hochgradige Thrombozytopenie (Referenzwerte 200 000 – 500 000 Thrombozyten/ μL ; YIN und NOLTE 2007).

Die kapilläre Blutungszeit (KBZ) ist ein einfacher und sensitiver Test für die Praxis (SUTOR 1998). Eine starke Thrombozytopenie sowie eine gestörte Thrombozytenfunktion zeigen sich in einer verlängerten Blutungszeit. Physiologische Blutungszeiten liegen bei ein bis vier Minuten.

Eine ausführliche Anamnese sollte ein besonderes Augenmerk auf Funktionsstörungen der Thrombozyten sowie die von-Willebrand-Erkrankung legen. Das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom ist ein angeborener Defekt, der bei bestimmten Rassen wie Pudel, Scotch Terrier und Sheltie gehäuft vorkommt und sich klinisch nicht immer deutlich zeigt. Der von-Willebrand-Faktor (vWF) bildet einen der beiden Anteile von Faktor VIII. Er schafft die Voraussetzungen für eine physiologische Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Der zweite Anteil, die Faktor-VIII-Gerinnungsaktivität (FVIII:C), spielt eine Rolle im plasmatischen Gerinnungssystem. Der vWF-Antigen-Test (ELISA) ermöglicht eine Aussage, ob es sich um homozygot kranke oder gesunde Tiere handelt. Für einige Hunderassen ist ein Gentest (PCR) etabliert. Meist unauffällige Thrombozytenwerte, ein normaler aPTT²-Wert sowie eine verlängerte KBZ (Fähigkeit zur Thrombusbildung) und erniedrigte vWF-Werte geben Hinweise auf einen bestehenden von-Willebrand-Faktor-Mangel.

4.2 Labordiagnose sekundärer Hämostasestörungen

Die sekundäre Hämostase lässt sich in das extrinsische und intrinsische System sowie eine gemeinsame Endstrecke einteilen. Zwei unterschiedliche Faktoren können die Gerinnungskaskade initiieren.

Die Freisetzung von Gewebsthromboplastin (Faktor III) aus geschädigten Blutzellen oder zerstörtem Gewebe führt zur Aktivierung von Faktor VII und wird als extrinsisches System bezeichnet. Faktor VII, Thromboplastin und Kalzium sind essentielle Bestandteile des extrinsischen Systems. Sowohl Gewebsthromboplastin als auch Kalzium sind immer in ausreichendem Maße vorhanden und können als Ursachen für Gerinnungsstörungen ausgeschlossen werden. Faktor-VII-Mangel wird mithin als verantwortlich für Störungen im extrinsischen System angesehen (YIN und NOLTE 2007).

Sogenannte Gruppentests können den endogenen, exogenen und gemeinsamen Teil der plasmatischen Gerinnung überprüfen. Die Faktor-XIII-abhängige Quervernetzung von Fibrin im letzten Schritt wird jedoch nicht mit einbezogen.

Eine Bewertung des exogenen und allgemeinen Gerinnungssystems kann durch die Prothrombinzeit (Quicktest) erfolgen (CHEE 2014, KLAMROTH 2014). Akuter Vitamin-K-Mangel

2 aPTT – aktivierte partielle Thromboplastinzeit.

z. B. durch kumarinhaltige Rodentizide, Lebererkrankungen, disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) und Faktor-VII-Mangel können zu einer Verlängerung der Prothrombinzeit führen. Das Messergebnis kann als Zeit in Sekunden kalibriert über einer Referenzkurve, als Prozent der Norm (Referenzwert 75–130 %) oder als Prothrombin-Ratio dargestellt werden (MISCHKE 1995). Bei verlängertem Quicktest und aPTT im Referenzbereich handelt es sich um eine Störung des extrinsischen Systems.

Faktor VIII und Faktor IX sind am intrinsischen (endogenen) System der Gerinnungskaskade beteiligt. Eine Störung des intrinsischen Systems lässt sich durch verschiedene Tests feststellen. Das intrinsische System wird durch Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen wie Kollagen oder körperfremden Materialien ausgelöst. Die Gerinnungsfaktoren XII, XI, IX und VIII sind an der Gerinnungskaskade in aktivierter Form beteiligt.

Die *Activated Clotting Time* (ACT) ist ein globaler Suchtest für das endogene System. Die ACT ist als einfacher und schneller Suchtest zu verstehen, der die Sensitivität der aPTT nicht erreicht, aber erste Hinweise auf intrinsische Störungen geben kann. Durch Zugabe eines Oberflächenaktivators (z. B. Kiesel Erde) zu Nativblut kann die benötigte Zeit bis zur Gerinnung gemessen werden.

Als sensitivster und spezifischster Test gilt die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die zugleich das endogene System und die gemeinsame Endstrecke testet (YIN und NOLTE 2007). Neben den Vorphasenfaktoren XII, XI, IX und VIII können so auch die Faktoren X und V auf Störungen überprüft werden. Faktor VII kann als einziger Faktor nicht erfasst werden. Kaolin, Celit oder Ellagsäure dienen als Oberflächenaktivator und werden mit partiellen Thromboplastinen und der Citratblutprobe vermischt. Anschließend erfolgt die Kontaktaktivierung der Faktoren XII und XI, welche das endogene System aktivieren. Durch die spätere Zugabe von Kalzium-Ionen kann die Gerinnungskaskade vollständig ablaufen (MISCHKE 1995).

Eine Veränderung der aPTT muss immer unter Bezug auf den Quickwert erfolgen. Sofern der Quickwert im Referenzbereich liegt und die aPTT verlängert ist, handelt es sich um eine Störung des endogenen Systems. Defizite der Gerinnungsfaktoren VIII (Hämophilie A), IX (Hämophilie B), XI oder XII sind möglich und bedürfen einer weiteren Abklärung durch Bestimmung der Restaktivität der noch vorhandenen Gerinnungsfaktoren. Ist die aPTT verlängert und der Quickwert erniedrigt, so ist ein Defekt der Gerinnungsfaktoren II (Prothrombin), V bzw. X denkbar.

Die Thrombinzeit (TT) wird als Test für die gemeinsame Hauptphase verwendet. Sie misst die Zeit, in der Fibrinogen (I) zu Fibrin umgewandelt wird. Oft findet sie als Kontrolle bei Heparintherapie oder bei Verdacht auf DIC, Mangel an Fibrinogen und schweren Hepatopathien Anwendung. Bei Aktivität gerinnungshemmender Stoffe oder erhöhter Menge von Fibrinolyseprodukten (DIC) ist die Thrombinzeit verlängert.

Koagulometrisch kann die spezifische Faktorenbestimmung der Gerinnungsfaktoren II–XII in ausgewählten Labors erfolgen. Sie dient zur weiteren Abklärung pathologischer Befunde von aPTT und Quicktest. Durch die Eingrenzung auf einen bestimmten Gerinnungsfaktor kann die Diagnose angeborener Hämostasestörungen (z. B. Hämophilie A oder B), die Ursache der Störung (erworben *versus* angeboren) und eine Verlaufskontrolle erfolgen (MISCHKE 1995).

5. Prognose

Von Hämophilie betroffene Tiere sind nicht heilbar. Die Lebenserwartung hämophiler Tiere ist verkürzt, hierbei rücken besonders Rüden mit schwerer Hämophilie A und große Rassen

in den Mittelpunkt. Schwere Formen der Hämophilie A führen oft zur Euthanasie oder natürlichem Tod im Welpenalter oder im ersten Lebensjahr, die Geschlechtsreife wird meist nicht mehr erreicht.

6. Therapie

Zur Behandlung hämophiler Hunde sind verschiedene Therapieformen etabliert (OLDENBURG 2015, NICHOLS et al. 2010). Durch lokale, blutstillende Maßnahmen kann ein verbessertes Allgemeinbefinden erreicht werden. Zu den lokalen Maßnahmen gehören Kompressen, Elektrokoagulation, Gefäßligaturen und Hämostyptika (PETERSON und DODDS 1979). Eine Antibiose ist bei infizierten Hämatomen und Blutungskrisen unbedingt notwendig. Gleichmaßen müssen Ekto- und Endoparasiten konsequent eliminiert werden. Das Futter sollte bei Blutungskrisen weich und hochwertig sein (DODDS 1977).

In schweren Fällen, lebensbedrohlichen Zuständen oder Blutungskrisen ist eine Substitutionsbehandlung mit Frisch- oder frisch-gefrorenem Plasma unabdingbar. Es wird in einer Dosierung von 15 mL/kg Körpermasse bei milder bis mittelschwerer Hämophilie und bei schwerer Hämophilie mit 20 mL/kg Körpermasse eingesetzt (STOKOL und PARRY 1998). Auch bei Operationen ist eine unterstützende Gabe von Blut- oder Plasmaprodukten notwendig, um Blutungen kontrollieren zu können. Da die Halbwertszeiten von Faktor VIII:C und IX nur kurz sind, müssen innerhalb der nächsten 12 bis 24 h weitere Gaben erfolgen.

Die Transfusion von Frischblut ist indiziert, wenn durch die Blutungen ein starker Verlust an Erythrozyten festgestellt werden kann. Das Substitutionsvolumen, und damit die Faktormenge, ist hier jedoch auf 20 mL/kg Körpermasse begrenzt. Überdies besteht die Gefahr einer Sensibilisierung des Patienten und von Unverträglichkeitsreaktionen.

Bei einer Hämophilie A stellt Kryopräzipitat (enthält Faktor VIII:C, aber keinen Faktor IX) eine sehr gute Therapie des FVIII-Mangels dar (MISCHKE 2003). Kryopräzipitat wird durch langsames Auftauen von gefrorenem Frischplasma gewonnen. Für die Behandlung der *Christmas Disease* ist es nicht geeignet. Die Herstellung von Kryopräzipitat ist aufwendig und spielt deshalb eine eher untergeordnete Rolle in der Therapie.

Eine weitere Behandlungsoption stellt die Verwendung kommerzieller Einzelfaktorkonzentrate von Schwein und Mensch dar. Durch den Gebrauch von Proteinen anderer Spezies kommt es zur Antikörperbildung und nachfolgenden Kreuzreaktionen gegen körpereigene Faktoren. Bei wiederholter Verabreichung sind Sensibilisierung und anaphylaktische Reaktionen nicht auszuschließen (BRINKHOUS et al. 1996).

7. Prophylaxe

Bei hämophilen Tieren ist in erster Linie die Vermeidung von Traumata indiziert, Einzelhaltung ist deshalb einer Rudelhaltung vorzuziehen (NICHOLS et al. 2010, BARR und MCMICHAEL 2012). Nutzungsarten, die mit einem erhöhten Traumarisiko verbunden sind, sollten unterbleiben. Ebenfalls sind nicht notwendige Eingriffe zu vermeiden. Unumgängliche Operationen dürfen nur nach einem ausführlichen präoperativen Screening und einer vorsorglichen Substitutionsbehandlung erfolgen. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf junge Rüden mit Rasedisposition für Hämophilie gerichtet werden.

Hunde mit Blutgerinnungsstörungen dürfen keine Medikamente erhalten, die einen negativen Einfluss auf die Hämostase haben (z. B. Plättchenfunktionshemmer, NSAID,³ Phenothiazinderivate, Antihistaminika und Sulfonamide) (DODDS 1977). Diese sind kontraindiziert, weil sie einen negativen Einfluss auf die Blutstillung haben. Medikamente sollten am besten oral verabreicht werden, notfalls ist auch eine intravenöse oder subkutane Eingabe möglich. Intramuskuläre Injektionen verursachen tiefe Muskelhämatome und sind deshalb kontraindiziert (DODDS 1977).

Der Zuchtausschluss von hämophilen Rüden und heterozygoten Hündinnen, die oft unerkannte Konduktorinnen sind, dient dazu, die Hämophilie in der betroffenen Zuchtlinie auszumerzen. Bei Blutungen ohne erkennbaren Grund oder ein ursächliches Trauma sollte eine ausführliche Anamnese mit Hinblick auf eine Blutgerinnungsstörung erfolgen, ein Blutgerinnungsscreening (besonders bei weiblichen Verwandten eines diagnostizierten hämophilen Rüden in der Familie) wäre als Abklärung sinnvoll. Von der Norm abweichende Blutgerinnungsparameter (verlängerte aPTT, Quicktest im Normbereich und verringerte Einzelfaktormessungen) können Hinweise auf eine Hämophilie liefern. Eine Züchterberatung ist angezeigt, um einer weiteren Verbreitung der Erbkrankheit entgegenzuwirken.

Für die Rassen Havaneser, Boxer (Hämophilie A) und Rhodesian Ridgeback (Hämophilie B) sind derzeit Gentests verfügbar (MISCHKE et al. 2011a, b). Für die Rasse Hovawart ist die Entwicklung eines Gentests geplant.

8. Hämophilie A und B beim Hund

Hämophilie gehört zu den hereditären Hämostasesstörungen (BARR und MCMICHAEL 2012). Es handelt sich um Störungen der sekundären Hämostase (= Blutstillung), die sich durch ein funktionelles und/oder quantitatives Fehlen von Faktor (F)-VIII:C-Protein (Hämophilie A) oder Faktor-IX-Protein (Hämophilie B) auszeichnen (MISCHKE 2012) und zu einer generalisierten Blutungsneigung führen. Betroffene männliche Tiere entwickeln eine unterschiedlich stark ausgeprägte Blutungsneigung, je nach Schweregrad des Mangels, Ausmaß des Traumas sowie Größe und Aktivität des betroffenen Individuums (FRY und MCGAVIN 2009).

9. Epidemiologie

Hämophilie A („Klassische Hämophilie“) konnte bislang bei Pferd, Rind, Hund und Katze dokumentiert werden (FRY und MCGAVIN 2009). Wie beim Menschen (1:10000) ist Hämophilie A auch beim Tier als wichtigste erbliche Hämostasesstörung zu bezeichnen. Hämophilie B („Christmas disease“) ist für Hund und Katze beschrieben und kommt bei Mensch (1:30000) und Tier wesentlich seltener vor (geschätzt drei- bis viermal häufiger Hämophilie A als B). Die Inzidenz bei Hund und Katze ist nicht bekannt (MISCHKE 2003).

Beide Hämophilieformen sind für eine Vielzahl von Hunderassen und Mischlingen erfasst. Weltweit konnte bisher bei über 30 Hunderassen Hämophilie A und bei 26 Rassen Hämophilie B beschrieben werden. In Deutschland wurde die Hämophilie A bislang beim Deutschen Schä-

³ NSAID – *Nonsteroidal anti-inflammatory drug*.

ferhund, Sibirischen Husky, Havaneser, Dackel und Malteser, Hämophilie B beim Deutsch Drahthaar, Rhodesian Ridgeback und Bernhardiner gefunden werden (MISCHKE 2003). Ras-sedispositionen sind stets zu beachten.

10. Klinische Symptomatik und Schweregradeinteilung

Die Erkrankungen lassen sich klinisch nur schwer voneinander abgrenzen. Weibliche Tiere bleiben meist asymptomatisch, selbst wenn sie heterozygot sind. Männliche Tiere sind gesund oder erkranken häufig schwer, sofern sie das Defektallel tragen. Bei Hämophilie A ist in der Regel mit stärkerer Blutungsneigung zu rechnen als bei Hämophilie B. Zu den typischen klinischen Symptomen zählen spontan oder nach einem Bagatelltrauma auftretende ausgedehnte Hämatome (subkutan, intra- und intermuskulär), anhaltende Blutungen nach Zahnwechsel oder -extraktion, Chippen, Läufigkeit, Traumata oder Verletzungen, Venenpunktion, Nagel-schneiden oder Operationen wie Kastration oder Schwanzamputation. Diese Art der schwer stillbaren Blutungen kann lebensbedrohlich werden. Überdies können die betroffenen Tiere aufgrund von Gelenkblutungen mit rezidivierenden Lähmungen oder Lahmheiten degenerative Arthropathien erleiden. Bewegungsstörungen sind Ausdruck von Weichteilblutungen (eventuell auch ins Rückenmark), die mit pathologischen Veränderungen wie Degeneration, Fibrose, Kontraktur der Muskulatur und Nervenschäden einhergehen. Nur vereinzelt werden Epistaxis (Nasenbluten), Blutungen in den Gastrointestinaltrakt und Hämoptysis (Bluthusten) als auch letale blutige Körperhöhlenergüsse beobachtet. Einige Fälle von tödlichen ZNS⁴-Einblutungen sind ebenfalls bekannt (MISCHKE 2012). Bei schwerer Hämophilie besteht die Gefahr einer fatalen Blutungskrise mit letalem Ausgang.

Erste Anzeichen einer Hämophilie beim Welpen können durch verlängerte Blutung aus der Nabelschnur nach der Geburt, beim Zahnwechsel oder Chippen festgestellt werden. Die Einteilung des Schweregrades der Hämophilie erfolgt nach der noch vorhandenen Aktivität des betroffenen Gerinnungsfaktors F VIII oder F IX (%), mit einzubeziehen sind weiterhin die Traumaexposition, Tiergröße und -aktivität. Tabelle 1 veranschaulicht die Einteilung in drei Schweregrade beim Menschen. Man unterscheidet schwere (< 1 % F VIII), mittelschwere (1–4 (5) % F VIII) und leichte Formen (5 [> 5] – 25 % F VIII) der Hämophilie A beim Menschen (MISCHKE 2012).

Tab. 1 Schweregrad der Hämophilie in Abhängigkeit von Faktor VIII- oder Faktor IX-Aktivität und Blutungssymptomen beim Mensch (modifiziert nach MISCHKE 2012)

Schweregradeinteilung	F VIII/F IX- Restaktivität (%)	Blutungsmanifestation
Schwer	< 1	Häufige Einblutungen in Muskeln und Gelenke, zum Teil ohne klare Ursache (Spontanblutungen); früher Beginn
Mittelschwer	1–4 (5)	Blutungen nach Operationen, Verletzungen oder Zahnextraktion, aber auch Bagatelltrauma
Leicht	5 (>5) – 25	Mögliche Blutungen nach Operationen oder starken Verletzungen/Traumen

4 ZNS – Zentralnervensystem.

Die Schweregradeinteilung für die humane Bluterkrankheit sollte nicht ohne Vorbehalte für die canine Hämophilie übernommen werden. Hunde haben im Vergleich zum Menschen eine höhere Blutungsaffinität bei definierter Faktorrestaktivität (DUNNING et al. 2009).

11. Molekulargenetische Ursachen der caninen Hämophilie

Weimaraner (DUNNING et al. 2009), Collie (BENN et al. 1978), Pudeln (GENTRY et al. 1977) und Deutsch Kurzhaar Pointer (JOSEPH et al. 1996) sind nur eine kleine Auswahl der Hunderassen, für die Hämophilie A in Fallberichten beschrieben wurde. Die Rassen Malteser (NAKATA et al. 2006), Schottischer Terrier (CAMPBELL et al. 1983) und Alaskan Malamute (PETERSON und DODDS 1979) veranschaulichen gut die starke Rassedivergenz, die bei caniner Hämophilie B ebenfalls herrscht. Gehäuft finden sich Fallberichte für die Rasse Deutscher Schäferhund, bei der beide Hämophilieformen beschrieben sind (FOGH 1988, FOGH et al. 1984, FELDMAN et al. 1995, JOHNSTONE und NORRIS 1984). Mutationen im FVIII- und FIX-Gen sind sehr heterogen. Bisher konnte auf molekularer Ebene nur ein Bruchteil der Ursachen für Hämophilie A und B aufgeklärt werden. Hierzu gehören bei Hämophilie A eine Geninversion für die Exons 23 bis 26 in der Hundekolonie von Chapel Hill (LOZIER et al. 2002) und in der davon unabhängigen Hundekolonie der *Queen's University* (Kanada; HOUGH et al. 2002). Beide Geninversionen zeigen eine starke Ähnlichkeit zur humanen Geninversion im Intron 22, der ca. 45 % der schweren Hämophilie-A-Patienten zugeschrieben werden können (HOUGH et al. 2002). Weiterhin wurde ein Stopcodon (MISCHKE et al. 2011b) als Ursache für Hämophilie A beschrieben. Für Boxer und Deutschen Schäferhund sind zwei „missense“-Mutationen mit Hämophilie A assoziiert (CHRISTOPHERSON et al. 2014). Beim Boxer findet sich eine strukturelle Veränderung in Form eines einzelnen Austauschs an der Nukleotidposition 1412 in Exon 10 von Cytosin zu Guanin, wodurch es auf Proteinebene zur Substitution von Arginin für Prolin (Aminosäure 471) kommt. Dabei ist die A2-Domäne des Faktors VIII von der Mutation betroffen. Ein weiterer Aminosäureaustausch in der A2-Domäne von Cystein zu Tyrosin (Aminosäure 548) in Exon 11 wurde beim Deutschen Schäferhund durch einen Nukleotidaustausch von Guanin zu Adenin an Position 1643 beschrieben (CHRISTOPHERSON et al. 2014).

Bei einer hämophilen Deutschen Dogge beschrieben ALACARAZ RODRIGUEZ et al. (2013) eine c.6217T>C-Punktmutation in Exon 21 des caninen FVIII-Gens. Die Aminosäure Tryptophan wird hier durch Arginin (Aminosäure 2073) in der C1-Domäne des caninen FVIII-Gens ersetzt. Weiterhin konnte bei einem betroffenen Pudeln-Mischling eine kurze Insertion (40–46 Basenpaare) in Exon 14 als Ursache für Hämophilie A identifiziert werden. Die Insertion führt zu einem vorzeitigen Stopcodon am Anfang der Insertion (c.3217–3219), wodurch es zu einem verkürzten Protein kommt. Dadurch fehlen dem Protein ein Großteil der B-Domäne sowie die vollständige A3-, C1- und C2-Domäne (ALACARAZ RODRIGUEZ 2012).

Auch bei caniner Hämophilie B variieren die ursächlichen Mutationen/Strukturveränderungen im FIX-Gen stark. In zwei nicht verwandten Hunderassen mit schwerer Hämophilie B konnte bei einer Rasse eine große Deletion der 5'-Region bis Exon 6 festgestellt werden. Eine 5kb-Insertion in Exon 8 konnte in der zweiten Hunderasse nachgewiesen werden (GU et al. 1999). EVANS und Mitarbeiter beschrieben die Auswirkungen einer Punktmutation (1477G>A) als Substitution von Glutaminsäure für Glycin (Aminosäure 379), die sich in der katalytischen Domäne des FIX-Gens befindet (EVANS et al. 1989) (Abb. 1). Beim Deutsch Drahthaar konnten BROOKS und Mitarbeiter eine LINE-1-Insertion in Intron 5 als Auslöser

des FIX-Gendefekts identifizieren (BROOKS et al. 2003). In einer Lhasa Apso-Kolonie mit nachgewiesener Faktor-IX-Defizienz wurde eine Leserahmenmutation durch die Deletion von 6 bp festgestellt (MAUSER et al. 1996) (Abb. 2). Eine vollständige Deletion des FIX-Gens führte bei einem Labrador Retriever zu starker Hämophilie B (BROOKS et al. 1997).

Bei der Rasse Rhodesian Ridgeback verursacht eine „missense“-Mutation in Exon 7 einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Glutaminsäure in der katalytischen Domäne des FIX-Gens und führt zu schwerer Hämophilie B (MISCHKE et al. 2011a). Die ursächliche Mutation bei einem hämophilen Fila Brasiliero konnte von ALCARAZ RODRIGUEZ (2012) auf ca. 900 Nukleotide stromaufwärts und mindestens 1000 Nukleotide stromabwärts von Exon 4 eingegrenzt werden.

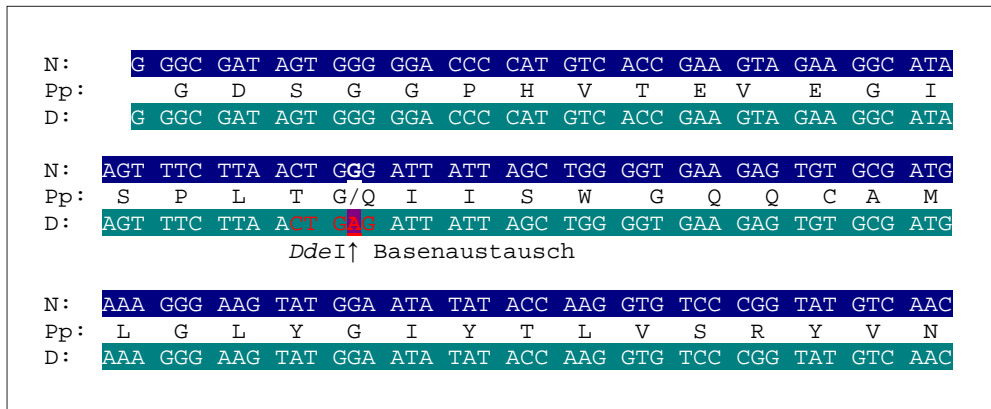


Abb. 1 Exon 8-Sequenzausschnitt des caninen FIX-Gens bei Hämophilie B in einer Hundepopulation der Universität North Carolina in Chapel Hill (EVANS et al. 1989). Die Abbildung zeigt einen 133 bp langen Abschnitt von Exon 8 des caninen FIX-Gens. Die ursächliche Mutation ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Durch den Nukleotidaustausch (G>A) kommt es zu einem Wechsel der Aminosäuren Glycin (GGG) zu Glutaminsäure (GAG). Die Mutation lässt sich mittels eines DdeI-RFLPs nachweisen (rote Buchstaben). N: Wildtyp-Sequenz; Pp: Proteinsequenz; D: Defektallel.

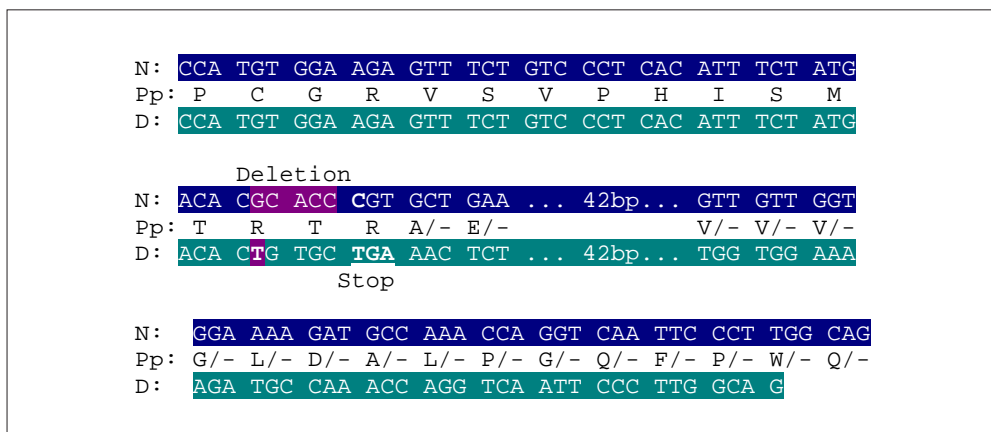


Abb. 2 Ursächliche FIX-Gen-Mutation für Hämophilie B in einer Lhasa Apso-Population (MAUSER et al. 1996). Die Abbildung zeigt einen Sequenzausschnitt von Exon 6 des caninen FIX-Gens. Durch eine 5 bp lange Deletion kommt es zu einer Leserahmenverschiebung mit vorzeitigem Termination und Trunkierung von FIX. N: Wildtyp-Sequenz; Pp: Proteinsequenz; D: Defektallel.

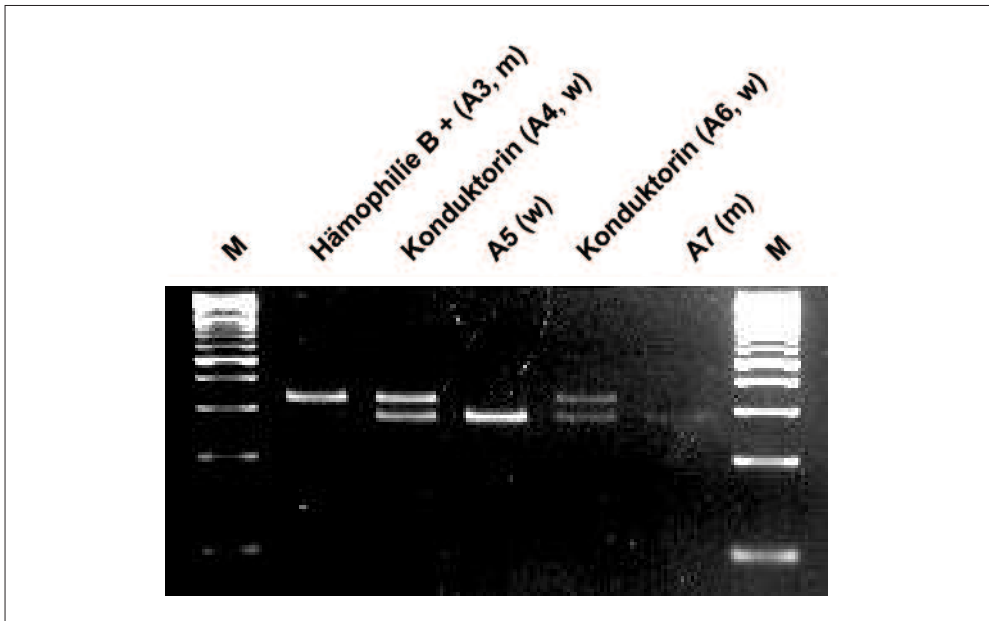


Abb. 4 Nachweis der ursächlichen Mutation mittels RFLP

Die Rüden verstarben oder mussten euthanasiert werden. Labordiagnostische Gerinnungsanalysen gesunder und erkrankter Familienmitglieder wurden neben den erhobenen klinischen Befunden mit einbezogen. Im Rahmen einer vergleichenden Sequenzierung der betroffenen Rüden sowie weiterer Mitglieder konnte eine Punktmutation im FIX-Gen identifiziert werden, die mit der Hämophilie segregiert (Abb. 3). Weitere Untersuchungen sollen Auskunft über die funktionelle Bedeutung dieser Mutation geben.

Literatur

- ALCARAZ RODRIGUEZ, P.: Molecular genetic analysis of haemophilia A and B in several dog breeds. PhD thesis, University of Veterinary Medicine Hannover 2012
- ALCARAZ RODRIGUEZ, P., KEHL, A., MUELLER, E., and MISCHKE, R.: FVIII gene mutations responsible for canine haemophilia A. 21. Jahrestagung der FG "Innere Medizin und klinische Labordiagnostik" der DVG (InnLab), München 1./2. Feb. 2013. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 41, 3 (2013)
- ARNOUT, J., HOYLAERTS, M. F., and LIJNEN, H. R.: Haemostasis. *Handb. Exp. Pharmacol.*; pp. 1–41 (2006)
- ARONSON, S. M.: A bloody path from Buckingham Palace to St. Petersburg. *Med. Health R. I.* 83, 235–236 (2000)
- BALTZIS, D., ELEFTHERIADOU, I., and VEVES, A.: Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv. Ther.* 31, 817–836 (2014)
- BARR, J. W., and MCMICHAEL, M.: Inherited disorders of hemostasis in dogs and cats. *Top. Companion Anim. Med.* 27, 53–58 (2012)
- BENN, D. M., GENTRY, P. A., and JOHNSTONE, I. B.: Classic hemophilia (hemophilia A) in a family of collies. *Can. Vet. J.* 19, 221–225 (1978)
- BRINKHOU, K. M., SIGMAN, J. L., READ, M. S., STEWART, P. F., MCCARTHY, K. P., TIMONY, G. A., LEPPANEN, S. D., RUP, B. J., KEITH, J. C. Jr., GARZONE, P. D., and SCHAUB, R. G.: Recombinant human factor IX: replacement therapy, prophylaxis, and pharmacokinetics in canine hemophilia B. *Blood* 88, 2603–2610 (1996)

- BROOKS, M. B., GU, W., BARNAS, J. L., RAY, J., and RAY, K.: A line 1 insertion in the factor IX gene segregates with mild hemophilia B in dogs. *Mamm. Genome* 14, 788–795 (2003)
- BROOKS, M. B., GU, W., and RAY, K.: Complete deletion of factor IX gene and inhibition of factor IX activity in a labrador retriever with hemophilia B. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 211, 1418–1421 (1997)
- CAMPBELL, K. L., GREENE, C. E., and DODDS, W. J.: Factor IX deficiency (hemophilia B) in a Scottish terrier. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 182, 170–171 (1983)
- CHEE, Y. L.: Coagulation. *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 44, 42–45 (2014)
- CHRISTOPHERSON, P. W., BACEK, L. M., KING, K. B., and BOUDREAUX, M. K.: Two novel missense mutations associated with hemophilia A in a family of Boxers, and a German Shepherd dog. *Vet. Clin. Pathol.* 43, 312–316 (2014)
- DODDS, W. J.: The diagnosis, management and treatment of bleeding disorders. Part 2. *Mod. Vet. Pract.* 58, 756–762 (1977)
- DUNNING, M. D., AVERIS, G. F., PATTINSON, H., TARGETT, M., CADE, S., and HERRTAGE, M. E.: Haemophilia A (factor VIII deficiency) in a litter of Weimaraners. *J. Small Anim. Pract.* 50, 357–359 (2009)
- EVANS, J. P., BRINKHOUS, K. M., BRAYER, G. D., REISNER, H. M., and HIGH, K. A.: Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10095–10099 (1989)
- FAVALORO, E. J., BODO, I., ISRAELS, S. J., and BROWN, S. A.: von Willebrand disease and platelet disorders. *Haemophilia* 20, Suppl. 4, 59–64 (2014)
- FELDMAN, D. G., BROOKS, M. B., and DODDS, W. J.: Hemophilia B (factor IX deficiency) in a family of German shepherd dogs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 206, 1901–1905 (1995)
- FOGH, J. M.: A study of hemophilia A in German shepherd dogs in Denmark. *Vet. Clin. North Amer. Small Anim. Pract.* 18, 245–254 (1988)
- FOGH, J. M., NYGAARD, L., ANDRESEN, E., and NILSSON, I. M.: Hemophilia in dogs, with special reference to hemophilia A among German shepherd dogs in Denmark. I: Pathophysiology, laboratory tests and genetics. *Nord Vet. Med.* 36, 235–240 (1984)
- FRY, M. M., and MCGAVIN, D. M.: Knochenmark, Blutzellen und lymphatische Gewebe. In: MCGAVIN, D. M., and ZACHARY, J. F. (Eds.): *Pathologie der Haustiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie*. S. 685–764. München: Urban & Fischer 2009
- GENTRY, P. A., JOHNSTONE, I. B., and SANFORD, S. E.: Diagnosis of classic hemophilia (hemophilia A) in a standard poodle. *Can. Vet. J.* 18, 79–81 (1977)
- GU, W., BROOKS, M., CATALFAMO, J., RAY, J., and RAY, K.: Two distinct mutations cause severe hemophilia B in two unrelated canine pedigrees. *Thromb. Haemost.* 82, 1270–1275 (1999)
- HARSHMAN, S. G., SALTZMAN, E., and BOOTH, S. L.: Vitamin K: dietary intake and requirements in different clinical conditions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 17, 531–538 (2014)
- HOUGH, C., KAMISUE, S., CAMERON, C., NOTLEY, C., TINLIN, S., GILES, A., and LILICRAP, D.: Aberrant splicing and premature termination of transcription of the FVIII gene as a cause of severe canine hemophilia A: similarities with the intron 22 inversion mutation in human hemophilia. *Thromb. Haemost.* 87, 659–665 (2002)
- JOHNSTONE, I. B., and NORRIS, A. M.: A moderately severe expression of classical hemophilia in a family of german shepherd dogs. *Can. Vet. J.* 25, 191–194 (1984)
- JOSEPH, S. A., BROOKS, M. B., COCCARI, P. J., and RIBACK, S. C.: Hemophilia A in a German shorthaired pointer: clinical presentations and diagnosis. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.* 32, 25–28 (1996)
- KEEVIL, J. J.: The illness of Charles, Duke of Albany (Charles I), from 1600 to 1612; an historical case of rickets. *J. Hist. Med. Allied Sci.* 9, 407–419 (1954)
- KLAMROTH, R.: Acquired bleeding disorders – diagnostic approach. *Internist (Berl.)* 55, 514–520 (2014)
- KWAAN, H. C.: Tumor growth and metastases in malignant disease. A review. *J. Med.* 19, 179–191 (1988)
- LANNON, N., and HERMANS, C.: The ‘royal disease’-hemophilia A or B? A haematological mystery is finally solved. *Haemophilia* 16, 843–847 (2010)
- LIPPI, G., FRANCHINI, M., MONTAGNANA, M., and FAVALORO, E. J.: Inherited disorders of blood coagulation. *Ann. Med.* 44, 405–418 (2012)
- LOZIER, J. N., DUTRA, A., PAK, E., ZHOU, N., ZHENG, Z., NICHOLS, T. C., BELLINGER, D. A., READ, M., and MORGAN, R. A.: The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12991–12996 (2002)
- MAUSER, A. E., WHITLARK, J., WHITNEY, K. M., and LOTHROP, C. D. Jr.: A deletion mutation causes hemophilia B in Lhasa Apso dogs. *Blood* 88, 3451–3455 (1996)
- MISCHKE, R.: Hämostase. In: KRAFT, W., and BALLAUF, B. (Eds.): *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. S. 84–103. Stuttgart u. a.: Schattauer 1995
- MISCHKE, R.: Blutbildungsstörungen. In: MISCHKE, R. (Eds.): *Praktische Hämatologie bei Hund und Katze*. S. 189–211. Hannover: Schlüter 2003

- MISCHKE, R.: Hämophilie A und B beim Hund. Tierärztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere *40*, 44–53 (2012)
- MISCHKE, R., KUHNLEIN, P., KEHL, A., LANGBEIN-DETSCH, I., STEUDLE, F., SCHMID, A., DANDEKAR, T., CZWALINNA, A., and MULLER, E.: G244E in the canine factor IX gene leads to severe haemophilia B in Rhodesian Ridgebacks. *Vet. J.* *187*, 113–118 (2011a)
- MISCHKE, R., WILHELM, C., CZWALINNA, A., VARVENNE, M., NARTEN, K., and DEPKA, M. VON: Canine haemophilia A caused by a mutation leading to a stop codon. *Vet. Rec.* *169*, 496b (2011b)
- MOSIER, D. A.: Zirkulationsstörungen und Thrombose. In: MCGAVIN, D. M., and ZACHARY, J. F. (Eds.): *Pathologie der Haustiere: allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie*. S. 61–91. München: Urban & Fischer 2009
- NAKATA, M., SAKAI, M., and SAKAI, T.: Hemophilia B in a crossbred Maltese dog. *J. Vet. Med. Sci.* *68*, 1223–1224 (2006)
- NICHOLS, T. C., RAYMER, R. A., FRANCK, H. W., MERRICKS, E. P., BELLINGER, D. A., DEFRIESS, N., MARGARITIS, P., ARRUDA, V. R., KAY, M. A., and HIGH, K. A.: Prevention of spontaneous bleeding in dogs with haemophilia A and haemophilia B. *Haemophilia* *16*, Suppl. 3, 19–23 (2010)
- NILSSON, I. M.: Haemophilia – then and now. *Sydsven. Medicinhist. Sallsk. Arsskr.* *31*, 33–52 (1994)
- OJEDA-THIES, C., and RODRIGUEZ-MERCHAN, E. C.: Historical and political implications of haemophilia in the Spanish royal family. *Haemophilia* *9*, 153–156 (2003)
- OLDENBURG, J.: Optimal treatment strategies for hemophilia: achievements and limitations of current prophylactic regimens. *Blood* *125*, 2038–2044 (2015)
- PEREDES, N., and CHAN, A. K.: The role of the vessel wall. *Methods Mol. Biol.* *992*, 31–46 (2013)
- PETERSON, M. E., and DODDS, W. J.: Factor IX deficiency in an Alaskan Malamute. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* *174*, 1326–1327 (1979)
- PEYVANDI, F., BOLTON-MAGGS, P. H., BATOROVA, A., and DE MOERLOOSE, P.: Rare bleeding disorders. *Haemophilia* *18*, Suppl. 4, 148–153 (2012)
- ROSNER, F.: Ancient descriptions of hemophilia and preconception gender selection. *JAMA* *252*, 900 (1984)
- ROSSOW, N., and STAUFENBIEL, B.: Hämostasestörungen. In: ROSSOW, N. (Ed.): *Innere Medizin für Tierärzte*. S. 91–104. Stuttgart: Ulmer UTB 1995
- RUGGERI, Z. M.: von Willebrand factor and fibrinogen. *Curr. Opin. Cell Biol.* *5*, 898–906 (1993)
- SAAD, E., and DALLY, N.: Insights into direct anticoagulants. *Blood Coagul. Fibrinolysis* *26*, 492–498 (2015)
- STASSEN, J. M., ARNOUT, J., and DECKMYN, H.: The hemostatic system. *Curr. Med. Chem.* *11*, 2245–2260 (2004)
- STOKOL, T., and PARRY, B.: Efficacy of fresh-frozen plasma and cryoprecipitate in dogs with von Willebrand's disease or hemophilia A. *J. Vet. Intern. Med.* *12*, 84–92 (1998)
- SUTOR, A. H.: The bleeding time in pediatrics. *Semin. Thromb. Hemost.* *24*, 531–543 (1998)
- YIN, S. A., and NOLTE, I.: Klinische Pathologie/Labordiagnostik. In: YIN, S. A., and NOLTE, I. (Eds.): *Praxisleitfaden Hund und Katze*. S. XVI. Hannover: Schlüter 2007
- VENUGOPAL, A.: Disseminated intravascular coagulation. *Indian J. Anaesth.* *58*, 603–608 (2014)
- WADA, H., MATSUMOTO, T., and YAMASHITA, Y.: Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *J. Intensive Care* *2*, 15 (2014)

Prof. Dr. Bertram BREINIG
Tierärztliches Institut
Georg-August-Universität Göttingen
Burckhardtweg 2
37077 Göttingen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 551 3933383
Fax: +49 551 3933392
E-Mail: bbrenig@gwdg.de

Erbfehler und Erbkrankheiten – „Ersünden“ ohne Sündenfall?

Gemeinsames Symposium der
Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW) und der
Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der
Wissenschaften
am 21. und 22. März 2013 in Wien

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 119, Nr. 402
Herausgegeben von Gottfried BREM (Wien)
(2015, 180 Seiten, 32 Abbildungen, 14 Tabellen, 22,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3414-2)

Tierzucht und Tiermedizin haben sich in über zehn Jahrtausenden parallel entwickelt. Ohne die eine gäbe es die andere nicht. Hinweise auf Erbfehler bei Tieren finden sich erst relativ spät. Dagegen spiegelte sich im Humanbereich die Erbfehlerproblematik bereits viel früher wider und führte zur umstrittenen Eugenik. Seit einigen Jahrzehnten beobachten wir in der Tiermedizin eine deutliche Verlagerung der Schwerpunkte. Der Trend geht im Nutztierbereich von der Einzeltiertherapie hin zur Herden- und Bestandsbetreuung, und in der Kleintier- und Pferdemedizin entwickeln sich bei der medizinischen Versorgung Standards, die sich an therapeutischen Möglichkeiten der Humanmedizin orientieren. Es scheint, dass Nutztiere im tierärztlichen Wirken in den Hintergrund geraten, wenn die Kleintiermedizin in den Vordergrund rückt. Die Diagnose von Erbfehlern bei Nutztieren und deren Bekämpfung sowie Bestrebungen zur genetisch züchterischen Optimierung von Krankheitsdispositionen müssen sich gegen diesen Trend behaupten. Daher zeigt der Band aktuelle Entwicklungen in diesem Bereich von Tierzucht und Tiermedizin auf, die von der vollständigen Sequenzierung von Nutztiergenomen über die physiologische Analyse der Wirkungen von Erbschäden bis zu Krankheitsmodellen für die Humanmedizin reichen.

X-chromosomal vererbte ektodermale Dysplasien bei Haustieren

Tosso LEEB ML (Bern, Schweiz)

Zusammenfassung

Ektodermale Dysplasien (ED) sind Entwicklungsstörungen, die mehr als ein Organsystem ektodermalen Ursprungs betreffen. Aus dem Ektoderm entstehen u. a. zahlreiche Strukturen der Haut wie z. B. Haare und Schweißdrüsen, aber auch Zähne, Fingernägel und viele weitere Drüsen.

Die erste wissenschaftliche Beschreibung einer ED erfolgte vermutlich durch Charles DARWIN im Jahre 1875. Er beobachtete in der Nähe von Hyderabad in Indien eine Familie mit einer Erbkrankheit, die heute X-chromosomale hypohidrotische ektodermale Dysplasie (XLHED) oder Christ-Siemens-Touraine-Syndrom genannt und X-chromosomal rezessiv vererbt wird. In dem folgenden Übersichtsartikel werden verschiedene bovine und canine Tiermodelle für XLHED beschrieben, die ähnlich wie die betroffenen menschlichen Patienten Gendefekte im *EDA*-Gen aufweisen.

Eine weitere X-chromosomal vererbte ED ist die Incontinentia pigmenti (IP), welche auch als Bloch-Sulzberger-Syndrom bezeichnet wird. IP wird X-chromosomal semidominant vererbt, d. h. betroffene Individuen sind obligat weiblich und heterozygot. Männliche Individuen, die den Gendefekt hemizygot tragen, sterben vor der Geburt ab. Die Charakterisierung einer Pferdefamilie ergab wiederum analog zu menschlichen Patienten, dass ein Gendefekt im *IKBKG*-Gen ursächlich für die equine IP ist.

Abstract

Ectodermal dysplasias (EDs) represent aberrations of development in more than one organ system of ectodermal origin. Amongst others the ectoderm gives rise to many structures in skin such as e.g. hair and sweat glands, but also teeth, finger nails, and many other secretory glands.

The first scientific description of an ED was provided in the year 1875 by Charles DARWIN. He observed a hereditary disease in a family living near Hyderabad, India. This disease is nowadays termed X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) or Christ-Siemens-Touraine syndrome and inherited as a monogenic autosomal recessive trait. In this review several bovine and canine animal models for XLHED will be described. Similar to the situation in humans, XLHED in these animals is caused by genetic variants within the *EDA* gene.

Incontinentia pigmenti (IP) also known as Bloch-Sulzberger syndrome represents another X-linked ED. IP is inherited as an X-chromosomal semidominant trait. Affected individuals are always female and heterozygous. Males carrying the genetic defect in hemizygous state die during fetal development. The analysis of a horse family revealed that a variant in the *IKBKG* gene causes equine IP. Variants in this gene are also responsible for human IP.

1. X-chromosomale hypohidrotische ektodermale Dysplasie (XLHED)

Noch vor Gregor MENDELS Studien zu den Gesetzmäßigkeiten der Vererbung machte Charles DARWIN folgende Beobachtung:

„Ich berichte [...] über eine Hindu-Familie aus Scinde, in der 10 Männer über den Verlauf von vier Generationen in beiden Kiefern zusammen nur 4 kleine und schwache Schneidezähne sowie 8 Backenzähne aufwiesen. Die so be-

troffenen Männer haben sehr wenige Haare auf dem Körper und werden bereits früh im Leben kahl. Während großer Hitze leiden sie stark unter einer übermäßigen Trockenheit der Haut. Es ist bemerkenswert, dass nie ein Fall einer so betroffenen Tochter auftrat und diese Tatsache erinnert uns daran, dass Männer in England viel eher als Frauen anfällig dafür sind, kahl zu werden. Obwohl die Töchter in der oben beschriebenen Familie nie selbst betroffen sind, geben sie die Anlage an ihre Söhne weiter und nie ist ein Fall aufgetreten, bei dem ein Sohn sie an seine Söhne weitergegeben hätte. Die Erkrankung tritt also nur in jeder zweiten Generation oder nach längeren Pausen auf.“¹

Mit dieser akkuraten Beschreibung hat Charles DARWIN sehr präzise die Gesetzmäßigkeiten des monogen X-chromosomal rezessiven Erbgangs erfasst und eine Krankheit beschrieben, welche wir heute X-chromosomale hypohidrotische ektodermale Dysplasie (XLHED) oder Christ-Siemens-Touraine-Syndrom nennen. Sie betrifft etwa 1 von 17000 Menschen weltweit.² XLHED-Patienten haben fast keine Haare sowie fehlende und falsch geformte Zähne, welche sehr aufwändige und langwierige Zahnrekonstruktionen erfordern. Aufgrund fehlender Schweißdrüsen ist ihre Temperaturregulation sehr instabil, und bei hohen Umgebungstemperaturen oder starker Anstrengung laufen sie Gefahr, in Hyperthermien zu geraten, die zu geistigen Behinderungen oder gar dem Tod führen können.

Die molekulargenetische Ursache der XLHED sind Varianten im *EDA*-Gen, welche die Funktion des kodierten Proteins Ectodysplasin beeinträchtigen. Ectodysplasin ist ein Signalmolekül, welches in der Fötalentwicklung die Anlage von Haaren, Zähnen und anderen ektodermalen Strukturen initiiert (KERE et al. 1996, MIKKOLA 2009).

Analoge Formen der XLHED wurde inzwischen auch bei Rindern und Hunden beschrieben. Bei Rindern sind mittlerweile 7 verschiedene Gendefekte bekannt, die zu XLHED führen (Tab. 1). Besonders bemerkenswert sind dabei zwei unabhängige Einzelbasenaustausche im Bereich von Exon 8 und der nachfolgenden Spleißstelle. Dieser Genbereich reguliert ein alternatives Spleißen, bei dem entweder das *EDA-A1*-Transkript oder das um 6 Basen verkürzte *EDA-A2*-Transkript gebildet werden (Abb. 1). Bei Rindern mit einer einzigen mutierten Base am Beginn von Intron 8 ist sowohl das Spleißen von Intron 8 als auch Intron 7 verändert, und es entsteht ein funktionsloses Transkript (DRÖGEMÜLLER et al. 2002). Bei Rindern mit einem anderen Einzelbasenaustausch im Exon 8 entsteht ein Transkript, bei dem das ganze Exon 8 fehlt (GARGANI et al. 2011). Diese beiden Varianten verdeutlichen die Komplexität der Regulation alternativer Spleißprozesse und unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Verbesserungen unserer heutigen Computerprogramme zur Vorhersage der funktionellen Konsequenzen von genetischen Variationen.

1 Übersetzt aus DARWIN 1875, Bd. 2, S. 319.

2 <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/hypohidrotic-ectodermal-dysplasia>.

Tab. 1 Bekannte XLHED-Varianten bei Rindern. Das *EDA*-Gen ist über 300 kb groß und bei einigen der strukturellen Varianten sind die Bruchpunkte nicht genau molekular charakterisiert.

Bereich des <i>EDA</i> -Gens	Genomische Variante	Konsequenz	Rasse	Referenz
Exon 1	c.48_66del19	Leserahmenverschiebung und vorzeitiges Stopkodon	Holstein-Friesian (JP)	OGINO et al. 2011
Exon 1	c.280_281insAGGG	Leserahmenverschiebung und vorzeitiges Stopkodon	Japanese Black (JP)	OGINO et al. 2012
Intron 1	LINE1 Insertion	„Exonisierung“ der Insertion, Leserahmenverschiebung und vorzeitiges Stopkodon	Red Holstein (Dk)	KARLSKOV-MORTENSEN et al. 2011
Exon 3 und flankierende Intronbereiche	Große genomische Deletion	Leserahmenverschiebung und vorzeitiges Stopkodon	Schwarzbunte Holsteins (D)	DRÖGEMÜLLER et al. 2001
Exon 6	c.730C>T; p.R244*	Nonsense-Variante	Kreuzungstier (Can)	DRÖGEMÜLLER et al. 2006
Exon 8	c.802G>A	Spleißdefekt	Holstein-Friesian (I)	GARGANI et al. 2011
Intron 8	c.924+2T>G	Spleißdefekt	Rotbunte Holsteins (D)	DRÖGEMÜLLER et al. 2002

Beim Hund ist bis jetzt nur eine Variante im *EDA*-Gen bekannt, die zu einer XLHED führt, dabei handelt es sich um einen Einzelbasenaustausch der letzten Base des Introns 8, der zu einem Spleißdefekt führt (CASAL et al. 2005). Hunde mit XLHED werden experimentell gehalten und sind sehr wertvoll für die Entwicklung einer Therapie für die humane XLHED. Es konnte gezeigt werden, dass postnatale intravenöse Injektionen mit rekombinantem Ectodysplasin bei XLHED eine Verbesserung der klinischen Symptome bewirken. Insbesondere kann eine deutliche Verbesserung der bleibenden Zähne nach dem Zahnwechsel durch die postnatale Gabe von Ectodysplasin erreicht werden. Damit besteht hier die seltene Chance, eine erbliche Entwicklungsstörung therapeutisch beeinflussen zu können. Gegenwärtig findet eine klinische Phase-2-Studie beim Menschen statt, um die klinische Wirksamkeit beim Menschen zu evaluieren.³

³ <http://edimerpharma.com/de>.

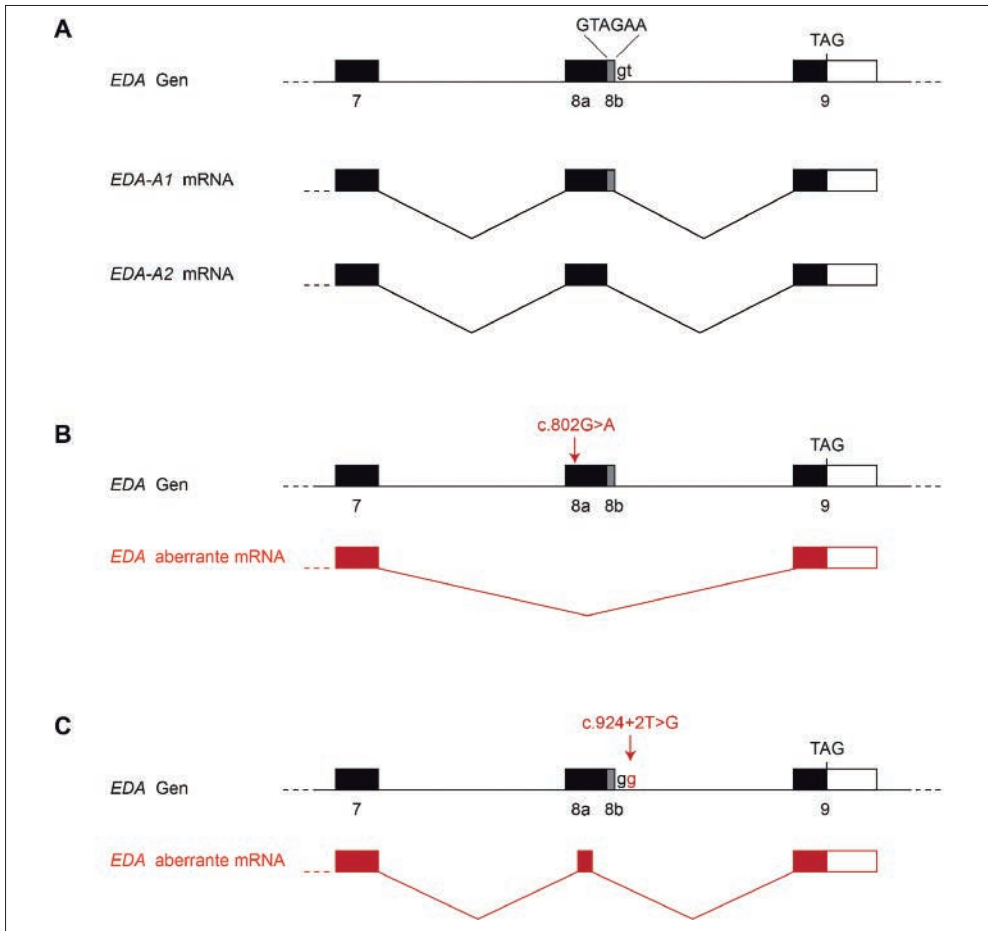


Abb. 1 Ungewöhnliche Spleißdefekte im bovinen *EDA*-Gen. (A) Darstellung der normalen Spleißvorgänge des *EDA*-Gens: Dieses Gen kodiert für zwei alternative Transkripte, die sich in 6 Basen unterscheiden, welche vom sogenannten Exon 8b kodiert werden. (B) In zwei italienischen Stierkälbern wurde ein exonischer Basenaustausch beobachtet, der zum Verlust des gesamten Exons 8 („Exon-Skipping“) in den *EDA*-Transkripten führte. Die Kälber, die diese Variante hemizygot trugen, waren von XLHED betroffen (GARGANI et al. 2011). (C) In einem deutschen Kalb wurde ein anderer Basenaustausch am Beginn des Introns 9 gefunden. Dieser Basenaustausch führte dazu, dass ein Transkript mit einem deutlich verkürzten Exon 8 entstand. Interessanterweise wurden dabei neue Spleißstellen sowohl am Ende wie auch am Anfang von Exon 8 aktiviert. Auch dieses Kalb war von XLHED betroffen (DRÖGEMÜLLER et al. 2002).

2. Incontinentia Pigmenti (IP)

Ectodysplasin ist ein parakriner Wachstumsfaktor, der an den Ectodysplasinrezeptor (EDAR) auf Zielzellen bindet (MIKKOLA 2009). Diese Ligand-Rezeptor-Bindung bewirkt die Aktivierung des sogenannten Ectodysplasin-Signaltransduktionswegs, bei dem u. a. NFκB⁴ aktiviert wird. Vor der Aktivierung ist NFκB im Zytoplasma lokalisiert und an das inhibitorische Protein IκB

4 NFκB – Nuclear Factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells.

gebunden. Die Aktivierung des Ectodysplasinrezeptors führt dazu, dass I κ B durch die I κ B-Kinase (IKK) phosphoryliert wird, worauf der Komplex aus I κ B und NF κ B dissoziiert. Das freie NF κ B transloziert in den Zellkern und steuert dort die Expression verschiedener Zielgene. Die I κ B-Kinase (IKK) besteht aus drei Proteinuntereinheiten. Beim Menschen ist bekannt, dass Mutationen im *IKBKG*-Gen für die regulatorische γ -Untereinheit der I κ B-Kinase, welche auch NEMO genannt wird, zur sogenannten Incontinentia pigmenti (IP) führen (SMAHI et al. 2000, ARADHYA et al. 2001). Diese Erkrankung tritt nur bei Frauen auf und führt zu Veränderungen der Haut und der Zähne sowie zum Teil unterschiedlicher weiterer Störungen. Die Veränderung der Haut verläuft in vier verschiedenen Phasen: perinatale Hautrötung und Bläschenbildung, gefolgt von warzenförmigen Läsionen und Hyperkeratose, anschließend Hyperpigmentierung und schließlich Narbenbildung (EHRENREICH et al. 2007).

Die für IP verantwortlichen Gendefekte im *IKBKG*-Gen liegen auf dem X-Chromosom und werden semidominant vererbt. Männliche Individuen, die den Gendefekt hemizygot auf ihrem X-Chromosom tragen, sterben noch vor der Geburt. Frauen mit IP sind obligat heterozygot für Gendefekte im *IKBKG*-Gen. Bei weiblichen Säugetieren wird in der frühen Embryonalentwicklung jeweils eine Kopie des X-Chromosoms inaktiviert. Bei IP-Patientinnen werden um den Zeitpunkt der Geburt die meisten Zellen eliminiert, in denen das defekte X-Chromosom aktiv ist, was zur ersten Phase der klinischen Symptome führt.

In einer eigenen Untersuchung konnte die Genetik einer Pferdefamilie untersucht werden, in der IP-Symptome bei vier Pferden auftraten (Abb. 2, TOWERS et al. 2013). Der Stammbaum dieser Familie wies auf einen X-chromosomal semidominanten Erbgang hin, da alle betroffenen Tiere weiblich waren und gehäufte Aborte von (vermutlich männlichen) Föten bemerkt wurden (Abb. 3).



Abb. 2 Phänotyp einer adulten Stute mit IP (TOWERS et al. 2013). Charakteristisch sind die gestromte Pigmentierung und haarlose Stellen, welche vernarbte Bereiche im Sinne des vierten und letzten IP-Stadiums darstellen. Die Muster der Hyperpigmentierung und der Hautläsionen folgen den sogenannten Linien von BLASCHKO, welche den klonalen Ursprung verschiedener Zellen mit jeweils dem einen oder anderen aktiven X-Chromosom sichtbar machen.

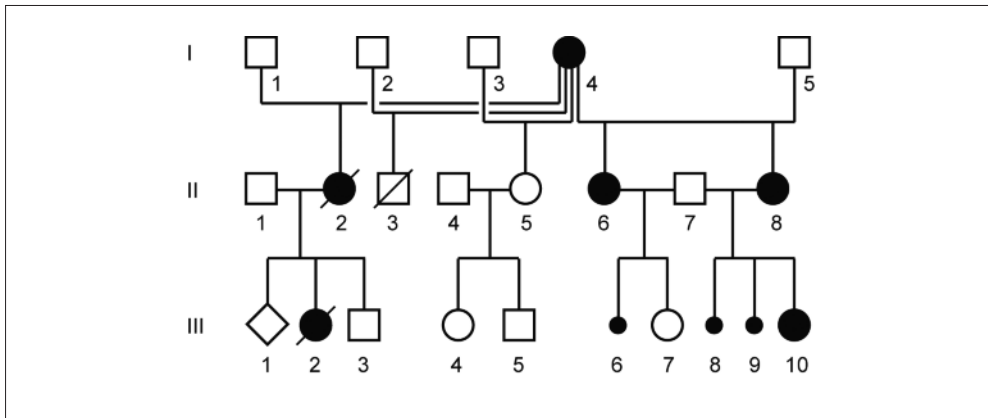


Abb. 3 Stammbaum der Pferdefamilie mit IP (TOWERS et al. 2013). Männliche Tiere sind als Quadrate, weibliche Tiere als große Kreise dargestellt. Kleine Kreise symbolisieren abgetriebene Föten unbekanntes Geschlecht. Betroffene Pferde sind durch schwarz ausgefüllte Symbole repräsentiert. Die Vererbung des Merkmals in dieser Familie folgt einem X-chromosomal semidominanten Erbgang.

Zur weiteren Analyse wurde das Genom einer betroffenen Stute mit der *Illumina*-Technologie und einer 19-fachen Abdeckung sequenziert. Die Analyse der Sequenzdaten ergab, dass die erkrankte Stute 557 nicht-synonyme heterozygote Sequenzvarianten auf dem X-Chromosom trug. 524 dieser Varianten traten auch bei mindestens einem von 44 nicht-betroffenen Kontrollpferden auf und kamen damit nicht mehr als ursächlich für die IP in Frage. Von den verbleibenden 33 privaten, nicht-synonymen, heterozygoten, X-chromosomalen Varianten betraf eine das *IKBK*G-Gen. Es handelte sich um einen Einzelbasenaustausch (c.184C>T), welcher ein Codon für die Aminosäure Arginin in ein Stopcodon umwandelt (p.Arg62*). Diese Variante fand sich bei allen drei IP betroffenen Stuten, von denen DNA verfügbar war (Abb. 4).

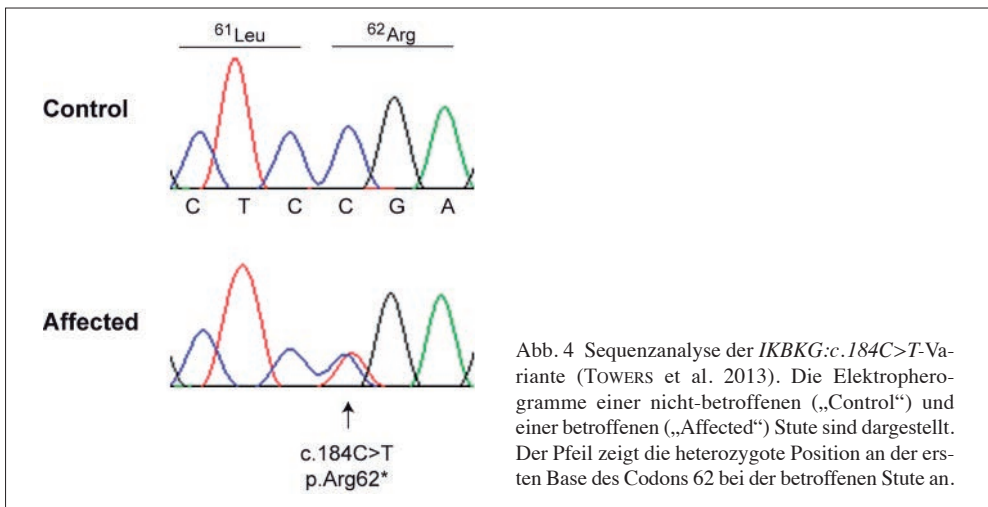


Abb. 4 Sequenzanalyse der *IKBK*:c.184C>T-Variante (TOWERS et al. 2013). Die Elektropherogramme einer nicht-betroffenen („Control“) und einer betroffenen („Affected“) Stute sind dargestellt. Der Pfeil zeigt die heterozygote Position an der ersten Base des Codons 62 bei der betroffenen Stute an.

In einer menschlichen IP-Patientin wurde eine völlig analoge Variante als kausal für die IP identifiziert (*IKBKG*:c.184C>T; p.Arg62*; ARADHYA et al. 2001). Die experimentellen Befunde in der Pferdefamilie zusammen mit den bekannten Daten über die Funktion des *IKBKG*-Gens legen die Kausalität dieser Variante für die equine IP sehr nahe.

3. Ausblick

Noch vor 20 Jahren schien es kaum vorstellbar, dass jemals die molekularen Grundlagen von ektodermalen Dysplasien bei Haustieren aufgeklärt würden. Durch die rasanten technischen Fortschritte der Molekulargenetik ist es heute in vielen Fällen möglich, relativ schnell die kausalen genetischen Defekte auch bei Haustieren zu identifizieren (LEEB 2012, 2014). Damit stehen wertvolle Tiermodelle zur Verfügung, die ein verbessertes Verständnis der Pathogenese erlauben und wie im Falle der XLHED-Hunde sogar bei der Entwicklung von Therapien für menschliche Krankheiten helfen können. Die X-chromosomal vererbten ektodermalen Dysplasien verdeutlichen eindrücklich die Konsequenzen der Inaktivierung einer Kopie des X-Chromosoms bei weiblichen Säugetieren.

Literatur

- ARADHYA, S., WOFFENDIN, H., JAKINS, T., BARDARO, T., ESPOSITO, T., SMAHI, A., SHAW, C., LEVY, M., MUNNICH, A., D'URSO, M., LEWIS, R. A., KENWRICK, S., and NELSON, D. L.: A recurrent deletion in the ubiquitously expressed NEMO (IKK- γ) gene accounts for the vast majority of incontinentia pigmenti mutations. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2171–2179 (2001)
- CASAL, M. L., SCHEIDT, J. L., RHODES, J. L., HENTHORN, P. S., and WERNER, P.: Mutation identification in a canine model of X-linked ectodermal dysplasia. *Mamm. Genome* 16, 524–531 (2005)
- DARWIN, C.: *Animals and Plants under Domestication*. 2nd ed. London: John Murray 1875
- DRÖGEMÜLLER, C., BARLUND, C. S., PALMER, C. W., and LEEB, T.: A novel mutation in the bovine *EDA* gene causing anhidrotic ectodermal dysplasia. *Arch. Anim. Breed.* 49, 615, 616 (2006)
- DRÖGEMÜLLER, C., DISTL, O., and LEEB, T.: Partial deletion of the bovine *ED1* gene causes anhidrotic ectodermal dysplasia in cattle. *Genome Res.* 11, 1699–1705 (2001)
- DRÖGEMÜLLER, C., DISTL, O., and LEEB, T.: X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia (ED1) in men, mice, and cattle. *Genet. Sel. Evol.* 35/1, S137–S145 (2003)
- DRÖGEMÜLLER, C., PETERS, M., POHLENZ, J., DISTL, O., and LEEB, T.: A single point mutation within the *ED1* gene disrupts correct splicing at two different splice sites and leads to anhidrotic ectodermal dysplasia in cattle. *J. Mol. Med.* 80, 319–323 (2002)
- EHRENREICH, M., TARLOW, M. M., GODLEWSKA-JANUSZ, E., and SCHWARTZ, R. A.: Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome): a systemic disorder. *Cutis* 79, 355–362 (2007)
- GARGANI, M., VALENTINI, A., and PARISET, L.: A novel point mutation within the *EDA* gene causes an exon dropping in mature RNA in Holstein Friesian cattle breed affected by X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *BMC Vet. Res.* 7, 35 (2011)
- KARLSKOV-MORTENSEN, P., CIRERA, S., NIELSEN, O. L., ARNBJERG, J., REIBEL, J., FREDHOLM, M., and AGERHOLM, J. S.: Exonization of a LINE1 fragment implicated in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia in cattle. *Anim. Genet.* 42, 578–584 (2011)
- KERE, J., SRIVASTAVA, A. K., MONTONEN, O., ZONANA, J., THOMAS, N., FERGUSON, B., MUNOZ, F., MORGAN, D., CLARKE, A., BAYBAYAN, P., CHEN, E. Y., EZER, S., SAARIALHO-KERE, U., DE LA CHAPPELLE, A., and SCHLESSINGER, D.: X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nature Genet.* 13, 409–416 (1996)
- LEEB, T.: Erbfehler bei Begleittieren. *Nova Acta Leopoldina* Bd. 113, Nr. 388, 183–190 (2012)
- LEEB, T.: Genomsequenzierungen zur schnelleren Aufklärung von Erbkrankheiten beim Hund. *Nova Acta Leopoldina* Bd. 119, Nr. 402, 21–30 (2015)

- MIKKOLA, M. L.: Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Amer. J. Med. Genet. A* *149A*, 2031–2036 (2009)
- OGINO, A., KOHAMA, N., ISHIKAWA, S., TOMITA, K., NONAKA, S., SHIMIZU, K., TANABE, Y., OKAWA, H., and MORITA, M.: A novel mutation of the bovine *EDA* gene associated with anhidrotic ectodermal dysplasia in Holstein cattle. *Hereditas* *148*, 46–49 (2011)
- OGINO, A., SHIMIZU, K., TANABE, Y., and MORITA, M.: De novo mutation of the bovine *EDA* gene associated with anhidrotic ectodermal dysplasia in Japanese Black cattle. *Anim. Genet.* *43*, 646 (2012)
- SMAHI, A., COURTOIS, G., VABRES, P., YAMAOKA, S., HEUERTZ, S., MUNNICH, A., ISRAËL, A., HEISS, N. S., KLAUCK, S. M., KIOSCHIS, P., WIEMANN, S., POUSTKA, A., ESPOSITO, T., BARDARO, T., GIANFRANCESCO, F., CICCODICOLA, A., D'URSO, M., WOFFENDIN, H., JAKINS, T., DONNAI, D., STEWART, H., KENWRICK, S. J., ARADHYA, S., YAMAGATA, T., LEVY, M., LEWIS, R. A., and NELSON, D. L.: Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature* *405*, 466–472 (2000)
- TOWERS, R. E., MURGIANO, L., MILLAR, D. S., GLEN, E., TOPF, A., JAGANNATHAN, V., DRÖGEMÜLLER, C., GOODSHIP, J. A., CLARKE, A. J., and LEEB, T.: A nonsense mutation in the *IKBKKG* gene in mares with incontinentia pigmenti. *PLOS ONE* *8*, e81625 (2013)

Prof. Dr. Tosso LEEB
Institut für Genetik
Vetsuisse-Fakultät
Universität Bern
Bremgartenstraße 109a
Postfach 8466
3001 Bern
Schweiz
Tel.: +41 31 6312326
Fax: +41 31 6312640
E-Mail: tosso.leeb@vetsuisse.unibe.ch

II. Mitochondriale extrachromosomale Vererbung

Genetische Regulation der mitochondrialen Biosynthese

Peter DOVC,¹ Jernej OGOREVC,¹ Tamara MILOŠEVIĆ BERLIČ,¹
Zhihua JIANG² und Tanja KUNEJ¹

Zusammenfassung

Mitochondrien sind die Zellorganellen, die eine zentrale Rolle im Energiemetabolismus der eukaryotischen Zellen spielen. Die Biogenese von Mitochondrien ist ein komplexer Prozess, an dem neben in den Mitochondrien synthetisierten Proteinen auch mehr als 1500 Proteine beteiligt sind, die für den Bau der Mitochondrien notwendig, aber in der genomischen DNA des Zellkerns der Wirtszelle kodiert sind, im Zytoplasma der Zelle synthetisiert und schließlich in die Mitochondrien importiert werden. Der Beitrag analysiert die Rolle der beteiligten Komponenten und die Auswirkungen von Mutationen in den entsprechenden Genen auf verschiedene Merkmale und Prozesse, wie Fleischqualität, Alterung oder Krankheiten.

Abstract

Mitochondria are cell organelles that play a key role in the energy metabolism of eukaryotic cells. The biogenesis of mitochondria is a complex process which involves proteins synthesized in the mitochondria, as well as more than 1,500 other proteins that are necessary for forming the mitochondria but which are coded in the genomic DNA of the nucleus of the host cells, synthesized in the cytoplasm of the cells and, finally, imported into the mitochondria. This paper analyses the role of the components involved and the impact that mutations in the corresponding genes have on various features and processes, such as meat quality, ageing or disease.

1. Einleitung

Mitochondrien sind die Zellorganellen, die eine zentrale Rolle im Energiemetabolismus der eukaryotischen Zellen spielen. Durch die oxidative Phosphorylierung und deren Endprodukt, das Adenosintriphosphat (ATP), das das zentrale Molekül für die chemische Speicherung der Energie ist, ermöglichen die Mitochondrien eine anhaltende Energieversorgung der eukaryotischen Zellen. Die Anzahl und Aktivität der Mitochondrien ist sehr von den Energiebedürfnissen der Zelle abhängig. So gibt es große Unterschiede in der Mitochondrienzahl zwischen verschiedenen Geweben des tierischen Organismus. In den Muskeln bestimmt die Anzahl der Mitochondrien den Typ des Muskels und somit auch weitgehend dessen physiologische Eigenschaften. Besonders in Geweben, in denen die Energieansprüche sehr hoch sind, sind die Zellen mit einer hohen Anzahl von Mitochondrien ausgestattet.

1 Institut für Tierzucht, Biotechnische Fakultät, Universität Ljubljana, Groblje 3, 1230 Domzale, Slowenien.

2 Washington State University, Department of Animal Science, Pullman, WA.

2. Die Herkunft der Mitochondrien

Es gibt klare Hinweise dafür, dass die Mitochondrien aus einem endosymbiontischen Verhältnis zwischen den prokaryotischen Gast- und eukaryotischen Wirtszellen stammen. Die prokaryotische Zelle hat in dieser Beziehung eine sichere und konstante Umgebung gefunden, die Wirtszelle hat aber durch die in der prokaryotischen Zelle vorhandene Maschinerie, die die oxydative Phosphorylierung durchführen kann, einen effizienten Mechanismus für die chemische Speicherung der Energie gewonnen. Mit der Zeit hat die prokaryotische Zelle einen immer größeren Anteil des eigenen Genoms in den Kern der Wirtszelle verlagert. So entstand eine enge funktionale Bindung zwischen den Genomen der Wirtszelle und des Mitochondriums. Folglich ist heute die Biogenese von Mitochondrien ein komplexer Prozess, in dem mehr als 1500 Proteine, die für den Bau der Mitochondrien notwendig sind, in der genomischen DNA des Zellkerns der Wirtszelle kodiert sind, im Zytoplasma der Zelle synthetisiert und schließlich in die Mitochondrien importiert werden. Dazu kommen noch mehr als ein Dutzend Proteinuntereinheiten, die im Mitochondrium genetisch verschlüsselt sind, dort synthetisiert werden und mit den importierten Proteinen funktionale Proteinkomplexe bilden. Bei den Wirbeltieren werden die Mitochondrien strikt maternal vererbt, und so sind alle Nachkommen eines weiblichen Organismus mit der gleichen mitochondrialen DNA (mtDNA) ausgestattet. Das macht mtDNA zu einem hervorragenden genetischen Marker, mit dem man die Vererbung über die weibliche Seite in den Populationen verfolgen kann. Wegen ihrer relativ hohen Mutationsrate und strikter matrilinealen Vererbung ist die mtDNA auch ein willkommenes Objekt für Populations- und Evolutionsstudien.

3. Die Struktur und Funktion der Mitochondrien

Die Mitochondrien haben eine komplexe Struktur, die optimal deren Funktion angepasst ist. Die mitochondriale Membran mit ihren zahlreichen Windungen (Cristae) sorgt dafür, dass der mitochondriale Innenraum von der Wirtszelle klar abgegrenzt wird. Zwischen der Innen- und Außenmembran entsteht ein Raum, durch den sich ein Protonengradient aufbaut, der die kontrollierte Übertragung von Phosphatgruppen an Adenosindiphosphat (ADP) ermöglicht. Dabei entsteht das ATP, das zentrale Molekül für die Energiespeicherung. Merkwürdigerweise wird die komplizierte Struktur des Mitochondriums nirgendwo genetisch verschlüsselt. Die unzähligen Versuche, die Mitochondrien aus einzelnen Bausteinen wieder zusammenzufügen (*self assembly*), sind restlos gescheitert. Dies bestätigt die These, dass die Mitochondrien nur durch verschiedene Strategien, die alle eine Teilung schon vorhandener Mitochondrien beinhalten, aus bereits vorhandenen Mitochondrien entstehen können. Das macht das Vorhandensein einer genetischen „Anleitung“ für die Zusammensetzung der Mitochondrien überflüssig.

Die Wirbeltiermitochondrien verfügen über ein eigenes genetisches System, das durch eine ringförmige, etwa 16 500 Basenpaare lange mtDNA repräsentiert wird. Die mtDNA zeigt eine für die Eukaryoten ungewöhnliche Dichte an kodierenden Regionen, die neben zwei ribosomalen RNA-Untereinheiten (rRNA) und 22 Transfer-RNAs (tRNA) noch 13 Proteinuntereinheiten der Elektronentransportkomplexe I, III, IV und V umfassen. Die in der mtDNA kodierten Proteinuntereinheiten stellen weniger als 5 % der in Mitochondrien vorhandenen Proteine dar und können allein kein funktionsfähiges Protein bilden. Alle 13 Proteinunterein-

heiten bilden zusammen mit den Proteinen, die im Wirtszellkern kodiert sind, Enzymkomplexe, die eine oxydative Phosphorylierung ermöglichen. Die im Mitochondrium kodierte tRNA reicht zwar für die Synthese der im Mitochondrium kodierten Proteinuntereinheiten aus, es wird aber trotzdem noch zusätzliche tRNA aus dem Zytoplasma importiert. Somit ist eine enge Verknüpfung zwischen dem mitochondrialen und dem Kerngenom der Wirtszelle entstanden. Diese Verknüpfung kam im Laufe der Evolution durch eine fortdauernde Verlagerung der genetischen Information aus den Mitochondrien in den Kern der Wirtszelle zustande, die heute eine enge gegenseitige Verbundenheit zwischen beiden genetischen Systemen bewirkt (Abb. 1).

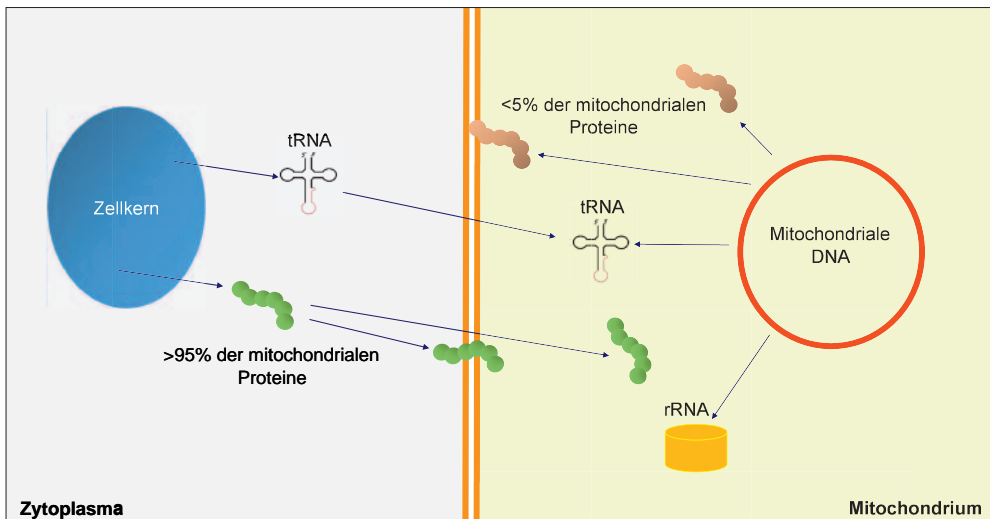


Abb. 1 Herkunft der in den Mitochondrien lokalisierten Proteine und tRNA-Moleküle

Da der Großteil der Proteine im Mitochondrium aus dem Zytoplasma importiert werden muss, steht für diesen Zweck ein komplexer Proteinapparat zur Verfügung. Die einzelnen Komponenten des Systems sind in der äußeren und inneren Membran der Mitochondrien verankert und ermöglichen einen genau kontrollierten Import durch die beiden Membranen sowie eine gezielte Lokalisierung der Proteine im Zwischenmembranraum. Die Hauptrolle beim Transport durch die Außenmembran spielen die Tom-Proteine (*translocase of the outer membrane*), wobei für den Transport durch die Innenmembran die Tim-Proteine (*translocase of the inner membrane*) ausschlaggebend sind. Sowohl Tom- wie auch Tim-Proteine gehören zu Proteinfamilien mit zahlreichen Mitgliedern, die mit ihrer Diversität verschiedene Kombinationen von Untereinheiten ermöglichen, die verschiedenen Proteinen und deren Transporteigenschaften angepasst sind. Die PAM-Proteine (*presequence translocase-associated motor*) steuern die Funktion der Matrix-Hsp70 (*matrix heat shock protein 70*), die durch ihre Chaperon-Funktion eine korrekte Faltung der importierten Proteine nach dem Erreichen ihrer Endlokation in der Matrix ermöglichen. Die SAM-Proteine (*sorting and assembly machinery*) sorgen für die Verankerung der Proteine mit ihrer β -Struktur in die Außenmembran der Mitochondrien (Abb. 2).

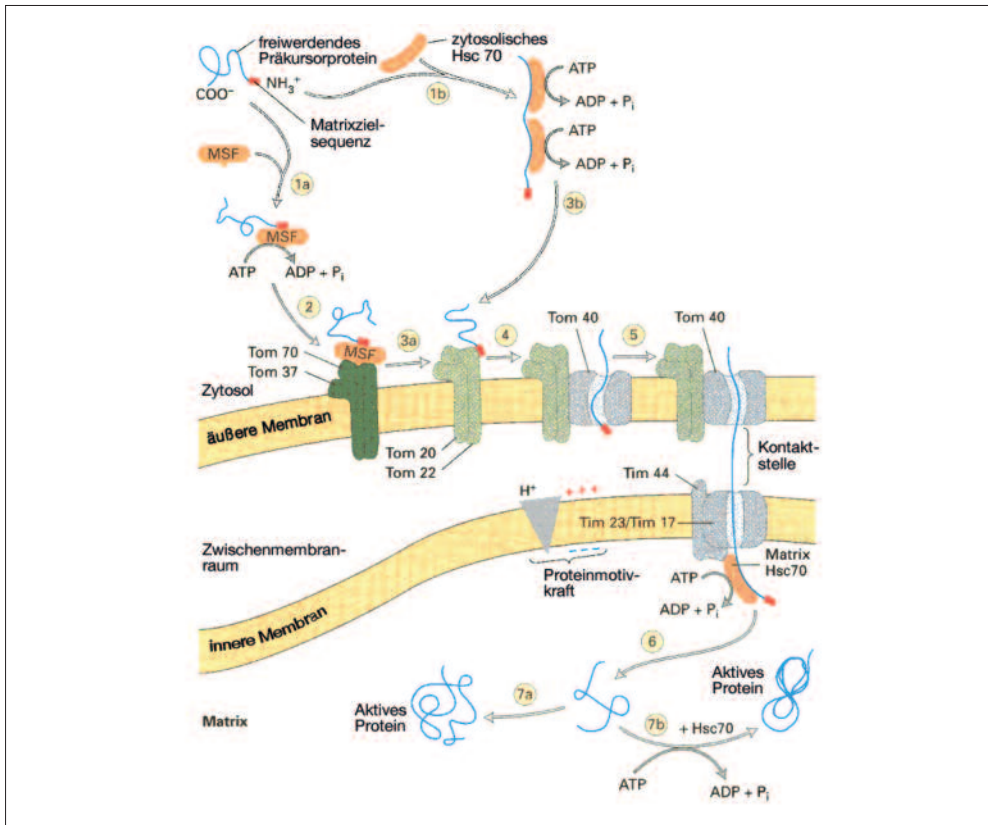


Abb. 2 Der Import von Proteinen in die Mitochondrien verlangt eine komplexe Maschinerie (nach GRIFFITH et al. 2012).

4. Die Regulation der mitochondrialen Biogenese unterliegt genetischen und Umweltfaktoren

Wie bereits erläutert, ist die Biogenese von Mitochondrien ein komplexer Vorgang, der zahlreichen genetischen und Umweltfaktoren unterliegt. Diese Komplexität der Regulation der mitochondrialen Biogenese ermöglicht eine den Bedürfnissen der Zelle gut angepasste Ausstattung mit Mitochondrien, die den jeweiligen Energieansprüchen der Zelle gerecht werden kann. Weil sich die Bedürfnisse der Zellen relativ schnell ändern können, ist es unabdingbar, dass eine effiziente Regulation der mitochondrialen Biogenese sowohl genetischen als auch Umweltfaktoren unterliegen muss.

5. Genetische Faktoren

Genetische Regulatoren der mitochondrialen Biogenese können prinzipiell in drei Gruppen eingeteilt werden: generelle Transkriptionsfaktoren (SP1, YY1, CREB), nukleare Respirati-

onsfaktoren (NRF-1, NRF-2) und nukleare Koaktivatoren (PGC-1 α , PGC-1 β), die über den Hauptregulator der Replikation und Transkription der mtDNA, TFAM, die mitochondriale Biogenese steuern. Die generellen Transkriptionsfaktoren sind durch ihre Bindungsstellen in zahlreichen Promotoren weitgehend für die allgemeine Regulation der Genexpression verantwortlich, darunter auch für die Regulation der Expression der Gene, die direkt mit der Biogenese von Mitochondrien verbunden sind. So sind SP1, YY1, NF κ B und CREB als generelle Transkriptionsfaktoren u. a. auch für die Regulation der Genexpression der nuklearen Respirationsfaktoren NRF1 und NRF2 verantwortlich, die maßgeblich die Transkription des mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM) stimulieren (LEE und WEI 2005). Der TFAM wird u. a. auch durch den nuklearen Koaktivator PGC-1 (SANTOS et al. 2011) stimuliert. Das verschafft dem PGC-1 eine zentrale Rolle in der Steuerung des Energiemetabolismus. Durch die höhere Expression von PGC-1 wird direkt die Biogenese der Mitochondrien stimuliert, die zu einer erhöhten Anzahl der Mitochondrien führt. Das gelingt durch die Stimulation der Transkription von TFAM, die hauptverantwortlich für die Replikation und Transkription der mtDNA ist. Eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Replikation und Transkription der mtDNA spielen auch zwei Polymerasen (POLG – DNA-Polymerase γ und POLRMT – mitochondriale RNA-Polymerase) (SUROVTSEVA et al. 2012) sowie auch die Helikase Twinkle (TYYNISMAA et al. 2004), die die Entwindung der mtDNA ermöglicht. Die Störungen in der Replikation und Transkription der mtDNA äußern sich in der verminderten Funktion der Mitochondrien und in der reduzierten Respirationskapazität der Zellen. Solche Veränderungen werden oft mit Alterungsprozessen, degenerativen Krankheiten, Apoptose und Krebs assoziiert (WALLACE 1999).

Der Promotor von TFAM beinhaltet die Bindungsstellen für zwei nukleare Respirationsfaktoren, NRF-1 und NRF-2, die auf diese Weise maßgeblich die Replikation der mtDNA beeinflussen (KUNEJ et al. 2009). Wegen seiner zentralen Rolle bei der Replikation der mtDNA ist die Konzentration der mtDNA eng mit der Konzentration von TFAM korreliert. TFAM bindet mit seiner Bindungsdomäne an die D-Loop-Region der mtDNA und ermöglicht so die Bindung des Polymerasenkomplexes. Bei den Menschen wurden bei der Zusammensetzung des POLRMT Polymerasenkomplexes noch zwei Transkriptionsfaktoren, TFBM1 und TFBM2, gefunden, die für die Regulation der Transkription und Stabilisierung der Transkripte verantwortlich sind (RANTANEN et al. 2003).

Eine Doppelmutation im Promotor von TFAM beim Rind (Abb. 3) führt zu einer günstigeren Verteilung des intramuskulären Fettes, zu sogenannter Fleischmarmorierung und besserer Fleischqualität (JIANG et al. 2005). Bei vielen Tierarten, aber auch beim Menschen, findet man zwei Formen von TFAM: eine längere Form, die alle Exons von TFAM beinhaltet, und eine kürzere Form, die als Folge eines alternativen Prozessierens von TFAM-mRNA, bei dem es zum Ausschneiden eines Exons kommt, entsteht. Beim Schwein ist die kurze Form, die um 34 Aminosäuren kürzer ist (KUNEJ et al. 2009), praktisch in allen Geweben vorhanden. Das Auslassen von 34 Aminosäuren verändert entscheidend die Struktur der kurzen Form von TFAM und entfernt eine helikale Domäne, die wahrscheinlich für die Bindung an die mtDNA verantwortlich ist. Deswegen ist die Bindungsaffinität der kurzen Form vermutlich beeinträchtigt. In diesem Zusammenhang ist es überraschend, dass die Kurzform trotz ihrer reduzierten Funktionalität bei den meisten Säugetierarten noch immer präsent ist. Vor kurzem wurde die Rolle der miRNA bei der Regulation der *TFAM*-Genexpression entdeckt. In der *TFAM*-mRNA wurde eine Bindungsstelle für die miR-27ab (5'-ACUGUGAA-3') gefunden, die bei neun Säugetierspecies hochkonserviert ist. Vermutlich ist die miR-27ab in die Feinregulation der *TFAM*-Genexpression einbezogen.

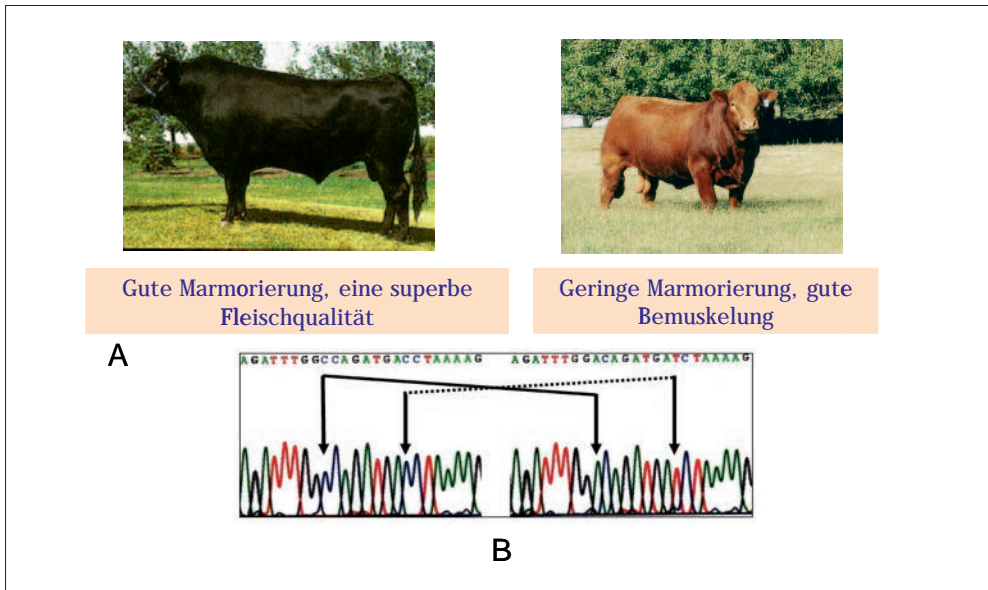


Abb. 3 (A) Auswirkungen auf die Fleischqualität beim Rind nach (B) Doppelmutation im Promotor von TFAM (JIANG et al. 2005)

PGC-1 ist Koaktivator von PPAR- γ und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Energiemetabolismus und Energieverbrauchs der Zelle (MILOSEVIC BERLIC und DOVC 2004). PGC-1 kodiert zwei nukleare Koaktivatoren, PGC-1 α und PGC-1 β , welche die mitochondriale Biogenese und die Replikation der mtDNA induzieren. Die erhöhte Expression von PGC-1 α/β führt zur Steigerung der mitochondrialen Biosynthese und folglich zu einer höheren Atmungs-effizienz der Zelle. PGC-1 induziert die Transkription des NRF-1 und beschleunigt die Synthese von ATP-Synthase, die für die Produktion von ATP unentbehrlich ist. Die Genexpression von PGC-1 wird über die cAMP – PKA – CREB-Achse reguliert und steht unter dem Einfluss von Umweltfaktoren wie Kälte und Energierestriktion. Bei der Steuerung der Genexpression von PGC-1 sind auch AMPK und SIRT1 beteiligt. Aktivierung von p38 MAPK erhöht die Expression von PGC-1 α . Durch die Unterdrückung der SOCS2-Expression wird die Aktivierung von MAPK und folglich PGC-1 α herunterreguliert. SIRT1 ist für die Stimulation der PGC-1-Expression notwendig und ist dadurch an der Simulation der PGC-1-abhängigen Glukoseproduktion beteiligt. Die SIRT1-Expression kann erfolgreich durch siRNA herunterreguliert werden.

Bei transgenen Mäusen mit einer Überexpression von PGC-1 und folglich auch höheren Konzentrationen von TFAM wurden in der Skelettmuskulatur eine erhöhte Anzahl von Mitochondrien und ein höherer Anteil von roten Muskelfaserzellen beobachtet. Auch in den Muskeln, in denen normalerweise der Anteil von roten Muskelfasern sehr niedrig ist, wurde ein Anstieg der Anzahl oxidativer Muskelfasern beobachtet (LIN et al. 2002, HANDSCHIN und SPIEGELMAN 2011). Folglich haben die Mäuse mit höherer Expression von PGC-1 mehr Ausdauer bei Übungen am Lauftrad gezeigt, und deren Muskelfasern konnten länger stimuliert werden und ermüdeten später im Muskelkontraktionstest als die Mäuse mit normaler Expression von PGC-1.

PGC-1 ist zwischen den Arten hochkonserviert (über 90 % der Nukleotidsequenz), und Mutationen haben oft phänotypische Konsequenzen. Beim Schwein führt eine A-T-Transversion an der Position 1290 im Exon 8 des PGC-1-Gens zu einem Ser-Cys-Aminosäureaustausch und ist rassespezifisch (Abb. 4). So ist das A-Allel (Ser) typisch für die Schweinerassen mit höherem Fleischanteil (Duroc, Pietrain, Yorkshire), wohingegen die T-Variante (Cys) charakteristisch für die Rassen mit höherem Fettanteil ist (Göttinger Minischwein, Mangalica, chinesische Rassen). Die Frequenzen von A- und T-Allel unterscheiden sich statistisch signifikant zwischen beiden Gruppen (KUNEJ et al. 2005). Beim Menschen wurde eine Assoziation zwischen Gly482Ser-Polymorphismus im PGC-1-Gen und Typ-2-Diabetes gezeigt, wobei die Diabetiker eine höhere Frequenz von Allel A aufweisen (KUNEJ et al. 2004). Ähnlich erhöht Genotyp AA auf dem PGC-1-Lokus bei Diabetikern die Gefahr für Retinopathien (GLOBOČNIK PETROVIĆ et al. 2005).

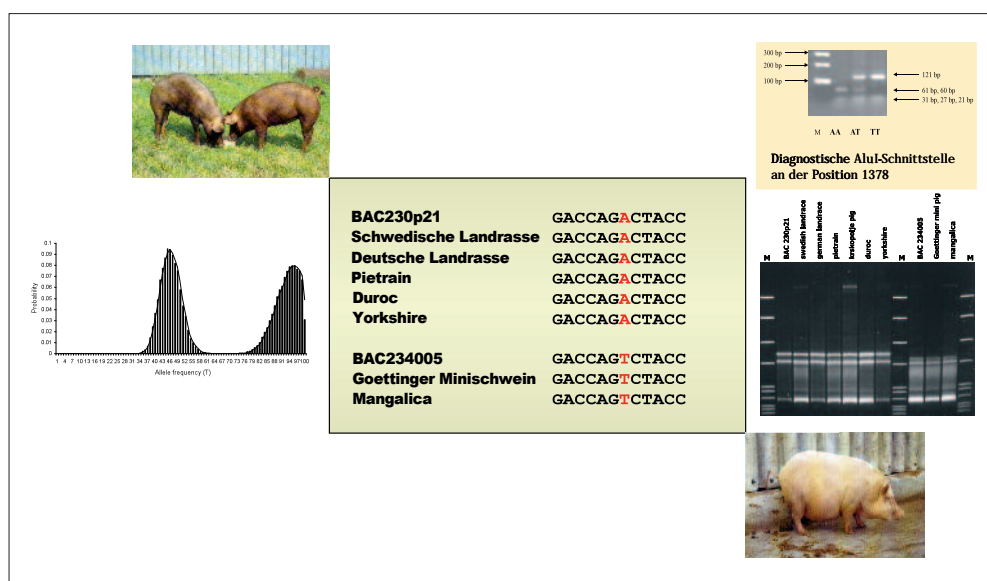


Abb. 4 Rassetypische Veränderungen in der Nukleotidsequenz von PGC-1 (KUNEJ et al. 2005)

Die Twinkle-Helikase wird durch die gemeinsame Promotorregion mit MrpL43 koreguliert, und die Überexpression von Twinkle in transgenen Mäusen erhöht die Anzahl der mtDNA-Moleküle um das Dreifache. Die Twinkle-Helikase ist für die Replikation der mtDNA notwendig und steuert so die Anzahl der mtDNA-Kopien in Säugetierzellen (TYYNISMAA et al. 2004).

6. Umweltfaktoren

Wegen ihrer zentralen Position im Energiemetabolismus der Zelle muss die mitochondriale Biogenese eine gewisse Empfänglichkeit für die Umweltreize aufweisen. Darunter spielen Kälte, Energierestriktion und physische Aktivität die wichtigste Rolle. Die Kälte stimuliert das sympathische Nervensystem und stimuliert über cAMP die Genexpression von PGC-1

und folglich die Transkription von TFAM. Hungern dagegen stimuliert die Genexpression von PGC-1 durch p38MAPK und AMPK, der phosphoryliert PGC-1 α und stimuliert so die mitochondriale Biosynthese (LETTIERI BARBATO et al. 2012). So führt bei jungen, nicht übergewichtigen Menschen die Energierestriktion in der Ernährung zu höheren Konzentrationen von mtDNA. Unter Energierestriktion zeigen menschliche Zellen des zentralen Nervensystems eine stark geschlechtsspezifische Reaktion. Die Zellen aus dem männlichen Organismus reagieren mit wesentlich stärkerem Anstieg von PGC-1, TFAM und NRF1. Das führt zu einem stärkeren Anstieg von mtDNA als in den Zellen aus dem weiblichen Organismus (SHARMA et al. 2014). Die physische Aktivität stimuliert auch die mitochondriale Biogenese, was schon seit Jahrzehnten aus den Erfahrungen mit dem Ausdauertraining im Sport bekannt ist.

Das Alter ist ein zusätzlicher Faktor, der die mitochondriale Funktion beeinflusst. Die Störungen in der Replikation und Transkription der mtDNA äußern sich in der verminderten mitochondrialen Funktion und in der reduzierten physiologischen Kapazität der Zellen. Solche Veränderungen werden oft mit Alterungsprozessen, degenerativen Krankheiten, Apoptose und Krebs assoziiert (WALLACE 1999). Mitochondrien haben eine eigene Dynamik, die durch verschiedene molekulare Mechanismen gesteuert wird. Die Störungen in dieser Dynamik sind mit verschiedenen Krankheiten verbunden: Charcot-Marie-Tooth-Typ 2A (ZÜCHNER et al. 2004), optische Atrophie von Ganglien in der Retina (ALEXANDER et al. 2000) und Neurodegeneration durch Tauopathien (BUÉE et al. 2000). Die mitochondriale Biogenese kann durch physische Aktivität stimuliert werden und so zur Verlangsamung der Alterungsprozesse beitragen (BEREITER-HAHN 2014).

7. Schlussbemerkung

Die mitochondriale Biogenese ist von zentraler Bedeutung für den Energiemetabolismus der Zelle. Der komplexe Prozess ist von zahlreichen genetischen als auch von Umweltfaktoren abhängig. Die Effizienz der mitochondrialen Biogenese hat einen entscheidenden Einfluss auf das Respirationsvermögen des Organismus und wird durch Alterungsprozesse allmählich verringert. Da aber der Prozess auch durch Umweltfaktoren gesteuert wird, kann man mit entsprechender Energierestriktion in der Ernährung und ausreichender physischer Aktivität dagegen steuern.

Literatur

- ALEXANDER, C., VOTRUBA, M., PESCH, U. E. A., THISELTON, D. L., MAYER, S., MOORE, A., RODRIGUEZ, M., KELLNER, U., LEO-KOTTLER, B., AUBURGER, G., BHATTACHARYA, S. S., and WISSINGER, B.: *OPA1*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature Genet.* 26, 211–215 (2000)
- BEREITER-HAHN, J.: Do we age because we have mitochondria? *Protoplasma* 251, 3–23 (2014)
- BUÉE, L., BUSSIÈRE, T., BUÉE-SCHERRER, V., DELACOURTE, A., and HOF, P. R.: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 33/1, 95–130 (2014)
- GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S. R., CARROLL, S. B., and DOEBLEY, J.: *Introduction to Genetic Analysis*. New York: W. H. Freeman and Company 2012
- GLOBOCNIK PETROVIC, M., KUNEJ, T., PETERLIN, B., DOVC, P., and PETROVIC, D.: Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene might be a risk factor for diabetic retinopathy in Slovene population (Caucasians) with type 2 diabetes and the Pro12Ala polymorphism of the PPARgamma gene is not. *Diabetes/Metabolism Res. Rev.* 21/5, 470–474 (2005)

- HANDSCHIN, C., and SPIEGELMAN, B. M.: PGC-1 coactivators and the regulation of skeletal muscle fiber-type determination. *Cell Metabolism* 13, 351 (2011)
- JIANG, Z., KUNEJ, T., MICHAL, J. J., GASKINS, C. T., REEVES, J. J., BUSBOOM, J. R., DOVC, P., and WRIGHT, J. R. Jr.: Significant associations of the mitochondrial transcription factor A promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu × Limousin F2 crosses. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 334, 516–523 (2005)
- KUJOH, G. C., BRADSHAW, P. C., HAROON, S., and PROLLA, T. A.: The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLOS Genet.* 3/2, e24 (2007)
- KUNEJ, T., GLOBOCNIK-PETROVIC, M., DOVC, P., PETERLIN, B., and PETROVIC, D.: A Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-g coactivator-1 (PPARGC1) gene is associated with type 2 diabetes in caucasians. *Folia Microbiol.* 50/5, 157–158 (2004)
- KUNEJ, T., JEVSINEK SKOK, D., ZORC, M., OGRINC, A., MICHAL, J. J., KOVAC, M., and JIANG, Z.: Obesity gene atlas in mammals. *J. Genomics* 1, 45–55 (2012).
- KUNEJ, T., WU, X.-L., MICHAL, J., MILOSEVIC BERLIC, T., JIANG, Z., and DOVC, P.: The porcine mitochondrial transcription factor a gene: molecular characterization, radiation hybrid mapping and genetic diversity among 12 pig breeds. *Amer. J. Animal Vet. Sci.* 4/4, 129–135 (2009)
- KUNEJ, T., WU, X.-L., MILOSEVIC BERLIC, T., MICHAL, J. J., JIANG, Z., and DOVC, P.: Frequency distribution of a Cys430Ser polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PPARGC1) gene sequence in Chinese and Western pig breeds. *J. Anim. Breed Genet.* 122/1, 7–11 (2005)
- LEE, H.-C., and WEI, Y.-H.: Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37/4, 822–834 (2005)
- LETTIERI BARBATO D., BALDELLI, S., PAGLIEI, B., AQUILANO, K., and CIRIOLO M. R.: Caloric restriction and the nutrient-sensing PGC-1 α in mitochondrial homeostasis: New perspectives in neurodegeneration. *Int. J. Cell Biol.* 12, 11 (2012)
- LIN, J., WU, P. H., TARR, P. T., LINDENBERG, K. S., ST-PIERRE, J., ZHANG, C. Y., MOOTHA, V. K., JÄGER, S., VIANNA, C. R., REZNICK, R. M., CUI, L., MANIERI, M., DONOVAN, M. X., WU, Z., COOPER, M. P., FAN, M. C., ROHAS, L. M., ZAVACKI, A. M., CINTI, S., SHULMAN, G. I., LOWELL, B. B., KRAINC, D., and SPIEGELMAN, B. M.: Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell* 119, 121–135 (2004)
- MILOSEVIC BERLIC, T., and DOVC, P.: Transkripcijsko uravnavanje adipogeneze in vloga koaktivatorja PGC-1 α . *Acta Agriculturae Slovenica* 84, 97–107 (2004)
- RANTANEN, A., GASPARI, M., FALKENBERG, M., GUSTAFSSON, C. M., and LARSSON, N. G.: Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2. *Mamm. Genome* 14/1, 1–6 (2003)
- SANTOS, J. M., TEWARI, S., GOLDBERG, A. F. X., and KOWLURU, R. A.: Mitochondrial biogenesis and the development of diabetic retinopathy. *Free Radical Biol. Med.* 51/10, 1849–1860 (2011)
- SHARMA, J., JOHNSTON, M. V., and HOSSAIN, M. A.: Sex differences in mitochondrial biogenesis determine neuronal death and survival in response to oxygen glucose deprivation and reoxygenation. *BMC Neuroscience* 2014/15, 9 (2014)
- SUROVTSEVA, Y. V., and SHADEL, G. S.: Transcription-independent role for human mitochondrial RNA polymerase in mitochondrial ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 41/4, 2479–2488 (2012)
- TYNYNMAA, H., SEMBONGI, H., BOKORI-BROWN, M., GRANYCOME, C., ASHLEY, N., POULTON, J., and JALANKO, A.: Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum. Mol. Genet.* 13/24, 3219–3227 (2004)
- WALLACE, D. C.: Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283/5407, 1482–1488 (1999)
- ZÜCHNER, S., MERSIYANOVA, I. V., MUGLIA, M., BISSAR-TADMOURI, N., ROCHELLE, J., DADALI, E. L., ZAPPIA, M., NELIS, E., PATITUCCI, A., SENDEREK, J., PARMAN, Y., EVGRAFOV, O., JONGHE, P. DE, TAKAHASHI, Y., TSUIJ, S., PERICAK-VANCE, M. A., QUATTRONE, A., BATTOLOGLU, E., POLYAKOV, A. V., TIMMERMAN, V., SCHRÖDER, J. M., and VANCE, J. M.: Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature Genet.* 36, 449–451 (2004)

Prof. Dr. Peter DOVC
 Institut für Tierzucht
 Biotechnische Fakultät
 Universität Ljubljana
 Groblje 3
 1230 Domzale
 Slowenien
 Tel.: +386 1 423 1161
 Fax: +386 1 423 1161
 E-Mail: peter.dovc@bfro.uni-lj.si

Rolle der Wissenschaft im Globalen Wandel

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung
vom 22. bis 24. September 2012 in Berlin

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 118, Nr. 400
Herausgegeben von Detlev DRENCKHAHN (Würzburg) und
Jörg HACKER (Halle/Saale)
(2013, 396 Seiten, 123 Abbildungen, 27 Tabellen, 29,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3210-0)

Gesellschaftliche Probleme verlangen heute sehr häufig eine Widerspiegelung im Bereich der Wissenschaften. Als Nationale Akademie der Wissenschaften ist die Leopoldina in zunehmendem Maße gefordert, auch Beratung bei Fragen zu liefern, die über Länder und Kontinentgrenzen hinausgreifen: Klimawandel, der Einsatz erneuerbarer Energien, Fragen der Gesundheitsversorgung, die Einrichtung einer effektiveren Landwirtschaft zur Bekämpfung von Hunger in Krisengebieten und die sich wandelnde Altersstruktur von Bevölkerungen in vielen Staaten sind nur einige Beispiele für entsprechende Gebiete mit dringendem Forschungsbedarf. Sie bilden Herausforderungen für die Gesellschaften, die nur in internationaler, oft globaler Zusammenarbeit zu bewältigen sein werden. Daher wählte die Leopoldina 2012 das Thema „Rolle der Wissenschaft im Globalen Wandel“ für ihre Jahresversammlung. Der Band umfasst Beiträge zu den Themenkomplexen „Die Erde im Globalen Wandel“, „Herausforderungen des Globalen Wandels“ und „Lösungswege von Problemen des Globalen Wandels“ sowie zu den gesellschaftlichen und politischen Implikationen der mit dem globalen Wandel verbundenen Prozesse.

Statistische Methoden zur Modellierung mitochondrialer extrachromosomaler Vererbung über mütterliche Linien in Daten aus der Milchrinderzucht

Hermann H. SWALVE und Monika WENSCH-DORENDORF (Halle/Saale)

Zusammenfassung

Als modellhafte Vorstellung zur Aufstellung statistischer Modelle kann der Vererbungsgang für die mtDNA vereinfachend als rein maternal angenommen werden. Dies bedeutet, dass sich mütterliche Linien etablieren müssten, welche weitgehend identische mtDNA aufweisen. Ein Standardmodell in der Tierzuchtwissenschaft ist das gemischte Tiermodell, welches außer fixen Größen zur Systematisierung der Umwelt einen zufälligen additiv-genetischen Effekt des Einzeltieres enthält, wobei die auftretenden Kovarianzen durch eine Pedigree-basierte Verwandtschaftsmatrix beschrieben werden. Für Datenmaterialien, welche sich über einen angemessenen Zeitraum erstrecken, so dass mindestens Großmutter-Mutter-Tochter-Ketten gebildet werden können, kann eine Kodierung der mütterlichen Linien erfolgen und dieser Effekt als zusätzlicher zufälliger Effekt in das statistische Modell genommen werden. Ein Vergleich der beiden resultierenden Modelle kann dann z. B. mit einem Likelihood-Quotienten-Test durchgeführt werden.

Das eigene Datenmaterial umfasste 29 Betriebe, Testherden in Mecklenburg-Vorpommern, mit 75071 Kühen (Milchmerkmale) bzw. 70062 Kühen (Rastzeit) aus den Kalbejahren 2000 bis 2013. Beide beschriebenen Modelle wurden für die Merkmale Milchmenge, Fettgehalt, Eiweißgehalt, logarithmierte Zellzahl, Fett:Eiweiß-Quotient (FEQ) und Rastzeit getestet. Signifikante Schätzwerte für die Komponente „mütterliche Linie“ ergaben sich lediglich für den Fettgehalt, eine tendenzielle Signifikanz ergab sich für die Zellzahl und den FEQ in der Größenordnung von 0,6 bis 2,6 % der additiv-genetischen Varianz. Der Einfluss der mütterlichen Linie ist mithin als gering einzustufen. Diese Schlussfolgerung ist auch in Übereinstimmung mit einer Reihe publizierter Studien. Problematisch ist jedoch die Nichtberücksichtigung weiterer genetischer Effekte, welche bei einer derartig vereinfachenden Betrachtung als Störgrößen auftreten können. Zukünftig wird es vermutlich möglich sein, Modelle zu entwickeln, welche sowohl Imprinting als auch Dominanz- und Epistasieeffekte und maternal-genetische Effekte neben den maternalen Linien berücksichtigen können. Es ist aber offenbar, dass derartige Modelle sehr hohe Anforderungen an die Datenstruktur und an den Umfang der Daten stellen werden.

Abstract

When setting up statistical models for the analysis of the inheritance of mitochondrial DNA (mtDNA), simplifications can be made by assuming a strictly maternal inheritance. In essence, this hypothesis means that maternal lines will exist which share identical mtDNA. In animal genetics, a standard statistical model for the analysis of data includes a fixed part pertaining to environmental effects and a random part denoting an additive genetic effect of the individual animal. Covariances among animals are accounted for by the numerator relationship matrix. When data is used which covers an appropriate time span, chains of at least grand-dam-dam-daughter can be identified and coded as maternal lines which in turn can be added to the above simple model as an additional random effect. The two models, the basic one, and the augmented one, then can be compared using e.g. a Likelihood-ratio test.

An own data set comprised 29 herds which were contract herds from Mecklenburg-Western Pomerania and included 75,071 cows for dairy production traits and 70,062 cows for the trait days-to-first-insemination (DFI) from calving years 2000 to 2013. Both general models as described above were applied for the traits milk yield, fat content, protein content, log cell counts, fat-to-protein ratio and DFI. Maternal lines were significant for fat content only while in ten-

dependency significance thresholds were approached for cell count as well as fat-to-protein ratio with a magnitude of 0.6 to 2.6 % of the additive genetic variance. Hence, the effect of maternal lines seems to be very small. This conclusion is also in line with a number of studies found in the literature. Neglecting genetic effects which may function as disturbance variables appears to be a problem in simplifying models. In the future, it should be possible to derive models which simultaneously can account for the effects of imprinting, dominance and epistasis and at the same time consider maternal genetic effects as well as maternal lines. It is clear that such models will have high requirements with respect to the structure and size of the data.

1. Einleitung

Die Atmungskette als Spezialfall einer Elektronentransportkette dient der Energiegewinnung der meisten Lebewesen. Sie findet in den Mitochondrien statt. Ebenfalls in den Mitochondrien findet sich als „Überbleibsel der Evolution“ die mitochondriale DNA (mtDNA), bei höheren Lebewesen als doppelsträngige Ringform. HUTCHISON et al. konnten 1974 nachweisen, dass neben der chromosomalen (Kern-) DNA auch DNA-Moleküle in den Mitochondrien des Cytoplasmas (mtDNA) existieren und dass auch bei Säugetieren eine zumindest überwiegend maternale Vererbung der Gene der mtDNA stattfindet. Auch wenn es heutiger Stand der Wissenschaft ist, dass die in Mitochondrien vorkommenden Proteine weit überwiegend von der Kern-DNA kodiert werden, so nehmen doch auch die wenigen, von der mtDNA kodierten Proteine an mitochondrialen Prozessen teil (CASTRO et al. 1998). Die Vererbung der mtDNA erfolgt nahezu ausschließlich durch die Weitergabe von der Mutter auf die Nachkommen, da sich die mtDNA der Mitochondrien der Spermien im Mittelteil und im Spermischwanz befinden und mithin bei der Befruchtung nicht in die Oozyte eindringen. In der klassischen Sichtweise der Bedeutung der mtDNA wird beim Säugetier von folgenden Hypothesen ausgegangen:

- Die mtDNA zeigt eine hohe Mutationsrate.
- Die Weitergabe der mtDNA erfolgt fast ausschließlich maternal.
- Es findet keine Rekombination statt.

Neuere Erkenntnisse (vgl. WHITE et al. 2008) zeigen jedoch, dass auch die nachstehend aufgeführten Hypothesen gelten:

- Paternale Weitergabe der mtDNA ist zwar selten, wird aber immer wieder nachgewiesen.
- Die Replikation der mtDNA unterliegt Bottleneck-Effekten.
- Heteroplasmie ist möglich.
- Auch Rekombination ist möglich (ROKAS et al. 2003).

Beim Rind wurde die Heteroplasmie der in einer Zelle vorkommenden mtDNA nachgewiesen (STEINBORN et al. 2000). Diese kann auf wenige Moleküle von mtDNA zurückgeführt werden, die bei der Fertilisation doch paternal übertragen wurden bzw. kann bereits beim weiblichen Individuum vorgelegen haben. Heteroplasmie ist für die mtDNA auch bei Individuen innerhalb von künstlich erzeugten Klonen nachgewiesen worden. Aufgrund der Tatsache, dass die klassische Sichtweise zwar sehr vereinfachend ist, die als neue Hypothesen aufgeführten Erkenntnisse bezüglich Heteroplasmie, paternalen Weitergabe und Rekombination jedoch Spezialfälle darstellen, wurde und wird in der Evolutionsbiologie häufig lediglich das klassische Modell genutzt: Aufgrund der hohen Mutationsrate und der (fast ausschließlichen) paternalen Weitergabe eignen sich vergleichende Studien an Proben von

mtDNA dazu, evolutionäre Vorgänge abzuklären und damit auch taxonomische Einordnungen abzuleiten.

In der Tierzuchtpraxis kommt immer wieder die Diskussion auf, ob nicht die maternale Linie eines Tieres Effekte auf den Phänotyp zeigt, ja mitunter wird in derlei Diskussionen sogar der maternalen Linie mehr Bedeutung zugemessen als den klassisch berechneten Zuchtwerten, welche ja den rein additiv-genetischen Wert eines Tieres bezeichnen. Die Tierzuchtwissenschaft wurde und wird hier also gefordert, um solche Hypothesen entweder zu erhärten oder abzulehnen. Gemäß der bereits eingangs gemachten Feststellung, dass zwar die überwiegende Zahl der in den Mitochondrien vorhandenen Proteine von der Kern-DNA kodiert werden, diejenigen Proteine, welche auf die mtDNA zurückgehen, jedoch auch eine Rolle spielen, sollte es möglich sein, die Bedeutung der mtDNA auch auf genetisch-statistischem Weg, gegebenenfalls verbunden mit molekularen Daten bezüglich von Polymorphismen der mtDNA, zu untersuchen. Beispiele früher Studien sind die Untersuchungen von DZAPO et al. (1983) bzw. DZAPO und WASSMUTH (1983, 1984) beim Schwein, von SCHÜLER et al. (1991) bei der Labormaus und von TESS et al. (1987) beim Fleischschind.

2. Statistische Modellierung von mtDNA-Effekten

Ausgangspunkt der Modellierung ist zunächst das klassische Modell der Populationsgenetik mit $P = G + U$, also der Determinierung des Phänotyps (P) aus Effekten des Genotyps (G) und aus Effekten der Umwelt (U). Nicht-additiv-genetische Effekte werden vernachlässigt, die Effekte von Dominanz und Epistasie also nicht berücksichtigt. Nachfolgend erfolgt eine Erweiterung des Grundmodells um weitere zufällige Effekte, namentlich um maternal-genetische Effekte und um Effekte maternaler Linien (Hypothese: Weitergabe der mtDNA erfolgt ausschließlich maternal).

Zusammenfassend lassen sich folgende Modelle in einfacher skalarer Schreibweise darstellen, wobei Subindices vernachlässigt werden (vgl. SOUTHWOOD et al. 1989):

$$\text{Modell [1]} \quad y = FE + a + e$$

$$\text{Modell [2]} \quad y = FE + a + m + e$$

$$\text{Modell [3]} \quad y = FE + a + ml + e$$

$$\text{Modell [4]} \quad y = FE + a + pe + e$$

$$\text{Modell [5]} \quad y = FE + a + sire + e$$

Mit y wird dabei der beobachtbare/gemessene Phänotypwert bezeichnet, FE steht für die Berücksichtigung systematisierbarer Umwelteinflüsse als fixe Effekte, und alle weiteren aufgeführten Effekte werden als zufällig angenommen. Der Zuchtwert eines Tieres (additiv-genetischer Tiereffekt) wird mit a bezeichnet, und m ist der maternal-genetische Effekt. Maternal-genetische Effekte sind zunächst lediglich additiv-genetische Tiereffekte, deren Wirkung aber beim Nachkommen deutlich wird (intrauterine Umwelt, Milchleistung der Mutter bei säugenden Nutztieren). Der Effekt der mütterlichen Linie ist ml , der Effekt der permanenten Umwelt der Mutter wird mit pe bezeichnet. Der ml -Effekt stellt die Effekte der mtDNA dar, während pe zwar Umwelteffekte bezeichnet, die aber mit jeder Mutter tierindividuell assoziiert sind. Schließlich ist auch Modell [5] denkbar, wobei der Effekt $sire$ Vater-effekte bezeichnet, welche nicht mit dem Tiereffekt a korreliert sind. Der Restfehler wird jeweils mit e bezeichnet. Theoretisch lassen sich alle fünf Modelle auch kombinieren, die

Zahl der zu schätzenden Effekte ist dann jedoch sehr groß, und es werden sehr hohe Anforderungen an die genetische Struktur des Datenmaterials gestellt. Beispielsweise erfordert schon Modell [2], dass ein Großteil der im zu verwendenden Datenmaterial enthaltenen Tiere selbst als Tier mit Phänotypwert, aber auch als Mutter vorkommt. Modell [3] erfordert, dass auch tatsächlich möglichst langkettige mütterliche Linien mit relativ vielen Mitgliedern identifiziert werden können.

Eine weitere Störgröße bei der Schätzung der obigen Effekte sind Imprinting-Effekte, wie sie beim Nutztier bereits mehrfach beschrieben wurden (z. B. GEORGES et al. 2003, BÖRNER und REINSCH 2009, NEUGEBAUER et al. 2010). NEUGEBAUER et al. (2010) verwendeten zur Schätzung der Imprinting-Effekte ein Modell, welches den additiv-genetischen Effekt eines Tieres aufteilt in einen Teil, welcher vom Vater, und einen Teil, welcher von der Mutter weitergegeben wurde:

$$\text{(Imprinting-Modell)} \quad y = FE + sire + dam + e$$

Wobei *sire* und *dam* die Effekte von Vater und Mutter bezeichnet. Bislang gibt es aufgrund von Problemen bei der Durchführung der Schätzung an einem geeigneten Tiermaterial keine Studie, welche alle in den Modellen [1] bis [5] enthaltenen Effekte mit dem Imprinting-Modell kombiniert.

3. Ergebnisse zur Bedeutung der mtDNA beim Milchrind

In einer Studie an nordamerikanischen Holsteins konnten SCHUTZ et al. (1992) die Bedeutung der maternalen Linie für Phänotypwerte der Milchleistung (Milchmenge, Fettmenge, Fettgehalt) in einem Modell, bei dem die Linie als fix aufgefasst wurde, nachweisen. Bei der Modellierung nach einem Modell analog zu Modell [3] verblieben lediglich signifikante Einflüsse für den Fettgehalt und den korrelierten Energiegehalt der Milch. In zwei weiteren Studien derselben Arbeitsgruppe (SCHUTZ et al. 1993, 1994) konnten auch direkte Assoziationen von Polymorphismen auf der mtDNA mit Merkmalen wie dem Fettgehalt sowie mit der Milchmenge und dem Überleben zur 2. Laktation abgesichert werden. Mit Ausnahme des Effektes auf Milch- und Fettmenge in der Studie von SCHUTZ et al. (1994) waren die gefundenen Effekte jedoch sehr klein. BOETTCHER et al. (1996) konnten keine Assoziation bei den von ihnen genutzten Polymorphismen des D-Loop der mtDNA mit Merkmalen der Milchleistung finden. Dieses Ergebnis steht in völligem Einklang mit der Studie von RON et al. (1993), die ebenfalls Polymorphismen im D-Loop untersucht hatten. SCHUTZ et al. (1992) untersuchten auch die Bedeutung maternal-genetischer Effekte (Modell [2]), welche aber nicht signifikant waren.

In einer neueren Studie von BERRY et al. (2008) wurden die Modelle [1] bis [4] kombiniert. Für den maternal-genetischen Effekt konnten kleinere Effekte für die Merkmale Milchmenge und Überleben abgesichert werden, für die maternale Linie war lediglich ein Effekt für die somatische Zellzahl in der 2. Laktation beobachtbar.

In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe (ONKEN 1993, ONKEN und SWALVE 1993) wurde versucht, ein besonders weit zurückreichendes Material bezüglich der verwendeten Pedigree-Information zu verwenden. Es fand sich ein Datenmaterial von 6 ostfriesischen Zuchtbetrieben, wobei die Kuhleistungen bis in das Jahr 1968/69 und die Abstammungen teils bis 1897 zurückverfolgt werden konnten. Eine Beschreibung des Materials findet sich in Tabelle 1.

Tab. 1 Beschreibung des Datenmaterials in der Studie von ONKEN (1993)

Betrieb	Anzahl Kühe			Anzahl Ahnen	Leistungsdaten	Abstammungen
	Total	≥ 270 MTG	Mit Eiweiß		Range	Range
1	394	365	283	989	1969–1991	1897–1989
2	322	296	232	876	1969–1991	1897–1989
3	333	280	240	522	1968–1991	1938–1989
4	596	538	419	719	1969–1991	1957–1989
5	425	376	285	418	1969–1991	1949–1989
6	288	266	209	450	1968–1991	1956–1989

In einem realen Datenmaterial stellt sich die Zuordnung der einzelnen Individuen zu maternalen Linien relativ problematisch dar. Es verbleiben immer einzelne Kühe ohne weitere Linienmitglieder (Single-Kühe), und auch die Größe der maternalen Linien ist stark streuend. Dies stellt Tabelle 2 dar. Sie zeigt aber auch, dass ein beträchtlicher Teil der maternalen Linien jeweils über den gesamten Beobachtungszeitraum gefunden werden konnte, d. h. Mitglieder aufwies. Die Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung nach Modell [3] mithilfe des REML-Verfahrens sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Linienvarianz als Anteil an der gesamten phänotypischen Varianz wird dabei als l^2 bezeichnet. Die Signifikanz des Linieneffektes wurde als Likelihood-Quotienten-Test aus dem Vergleich von dem gleichfalls verwendeten Modell [1] gegen das Modell [3] getestet. Lediglich für Betrieb 4 ergibt sich ein signifikanter Einfluss der maternalen Linie für die Milchmenge. Wie aus den Tabellen 1 und 2 ersichtlich, war Betrieb 4 der größte im Datenmaterial enthaltene Betrieb, welcher auch ein vergleichsweise günstiges Verhältnis von permanent vorhandenen Linien zu allen maternalen Linien aufwies, allerdings lediglich über einen Zeitraum von 22 Jahren (Leistungsdaten) zurückverfolgt werden konnte.

Tab. 2 Übersicht über die gefundenen maternalen Linien in der Studie von ONKEN (1993)

Betrieb	Anzahl		Liniengröße
	Kühe single	Linien tot./perm.	
1	12	9/8	2–81
2	22	7/6	3–100
3	9	10/8	2–60
4	54	45/15	2–154
5	2	18/12	2–110
6	4	13/10	2–82

Tab. 3 Ergebnisse zur Schätzung des Anteils der Linienvarianz an der Gesamtvarianz (I^2) in der Studie von ONKEN (1993)

Betrieb	Milchmenge		Fettgehalt		Fettmenge		Eiweißgehalt		Eiweißmenge	
	I^2	SE	I^2	SE	I^2	SE	I^2	SE	I^2	SE
1	,02	,09	,00	–	,00	–	,00	–	,04	,07
2	,00	–	,00	–	,00	–	,00	–	,00	–
3	,01	,10	,01	,09	,00	–	,00	–	,01	,08
4	,07*	,06	,02	,07	,00	–	,01	,08	,02	,10
5	,07	,06	,02	,07	,04	,07	,05	,05	,06	,07
6	,01	,07	,00	–	,03	,04	,02	,09	,00	,10

* = signifikant nach LRT mit $p \leq 0,05$
 – = SE nicht sinnvoll bzw. nicht ableitbar

Aus der Studie von ONKEN (1993) ist schlussfolgernd festzuhalten, dass insgesamt das Datenmaterial im Umfang nicht ausreichend war. Hierauf deuten die hohen Standardfehler hin. Neben der Zahl der berücksichtigten Individuen insgesamt erscheint auch die Zahl der Mitglieder der Linien von Bedeutung für die Schätzbarkeit der zu untersuchenden Effekte.

4. Eigene Arbeiten an Daten aus Testherden in Mecklenburg-Vorpommern

4.1 Material und Methoden

Die Arbeitsgruppe Tierzucht des Instituts für Agrar- und Ernährungswissenschaften betreut das Testherdenprojekt des dortigen Rinderzuchtverbandes (seit 2014 unter dem Namen RinderAllianz) wissenschaftlich und hat damit ständigen Zugriff auf alle anfallenden Daten. Das Testherdenprogramm wurde ursprünglich zur Nachkommenprüfung von Bullen in großen Herden (ca. 30 Herden mit > 800 Kühen je Herde) begründet und dient heute der Erfassung von speziellen Phänotypdaten, insbesondere für genomisch ausgerichtete Projekte. Sogenannte Standarddaten, wie Milchleistungen und Reproduktionsgeschehen, liegen für jede Kuh immer vor. Das Material eignet sich für genetisch-statistische Auswertungen besonders gut, da die verwendeten Väter zur Hälfte nach Versuchsplänen eingesetzt werden. Das hat zur Folge, dass eine besonders gute Kreuzklassifikation von Bullen \times Herden existiert. Aus dem vorliegenden Material wurde stellvertretend für Produktionsmerkmale die Milchmenge, der Fett- und Eiweißgehalt sowie die Zellzahl des jeweils 3. Kontrolltags in der 1. Laktation sowie stellvertretend für Merkmale des Reproduktionsgeschehens die Rastzeit (Zeit von der 1. Kalbung bis zur 1. Besamung während der 1. Laktation) extrahiert. Aus den Merkmalen Fett- und Eiweißgehalt wurde weiter der Fett-Eiweiß-Quotient durch einfache Division berechnet, die Zellzahl wurde wie international üblich logarithmisch transformiert. Das Datenmaterial umfasste 29 Betriebe mit 75071 Kühen (Milchmerkmale) bzw. 70062 Kühen (Rastzeit) aus den Kalbjahren 2000 bis 2013. Als wichtigster Umwelteffekt ließen sich 4782 Herdentesttage (HTD),

Kontrolltage) identifizieren. Der Abstand des jeweiligen 3. Kontrolltages von der Kalbung wurde mithilfe des bekannten Modells nach ALI und SCHAEFFER (1987) berücksichtigt. Zur Definition der maternalen Linie wurden folgende Regeln verwendet:

- (a) Alle Kühe mit unbekannter Mutter bekommen ihre Tiernummer als Mutterlinieneffekt und bilden damit die Menge ML1.
- (b) Alle Kühe mit Müttern aus ML1 erhalten denselben Mutterlinieneffekt wie ihre Mutter und werden in ML1 aufgenommen.
- (c) Wiederhole (b) so lange, bis alle Kühe einer Mutterlinie zugeordnet sind.

Insgesamt konnten 6652 Mutterlinien (Mittel also ca. 11 Kühe je Linie) mit mindestens 5 Phänotypen identifiziert werden.

Die Schätzmethode war das REML-Verfahren mit der Anwendung eines fixen Testtags-Tiermodells. Gemäß der im Abschnitt 2. gegebenen Definition wurde das Modell [3] gegen das Modell [1] geprüft, zum einfachen Modell wurde also für Modell [3] jeweils ein zufälliger Effekt der maternalen Linie ergänzt. In vereinfachter, skalarer Schreibweise ergaben sich damit für die beiden Merkmalskomplexe die beiden folgenden, das allgemeine Modell [3] repräsentierenden Modelle:

Modell [I] $y = \mu + HTD + EKA + KJ + AS(dim) + tier + ml + e$ (Milchmerkmale)

Modell [II] $y = \mu + H + EKA + KJ + tier + ml + e$ (Rastzeit)

Dabei (fixe Effekte in Großbuchstaben, zufällige Effekte in Kleinbuchstaben) bezeichnet *HTD* den Herdenkontrolltagseffekt, *EKA* das Erstkalbealter (in Klassen), *KJ* das Kalbejahr, *AS(dim)* die Berücksichtigung der Ali-Schaeffer-Funktion in Abhängigkeit von den Tagen in Milch, *tier* den additiv-genetischen Tiereffekt (Zuchtwert), *ml* die maternale Linie, *e* den Restfehler und *H* den Herdeneffekt. Für den Tiereffekt wurde die vollständige additiv-genetische Verwandtschaftsmatrix aufgestellt, der zufällige Effekt der maternalen Linie wies keine Korrelation mit dem Tiereffekt auf. Im Sinne von Abschnitt 2. sind beide Modelle damit Modell [3] zuzuordnen, Modell [1] ergibt sich einfach unter Weglassung des *ml*-Effektes; beide Modelle wurden auch im Sinne von Modell [1] angewendet. Modell [3] erweitert das Modell [1] genau um einen zufälligen Effekt, und damit ist ein Likelihood-Quotienten-Test (χ^2 -Verteilung, 1 FG) zum Vergleich der Modelle bzw. zum Testen der Signifikanz des *ml*-Effektes möglich.

Für die Schätzwerte der Heritabilität (h^2) und des Anteils der maternalen Linienvarianz (l^2) ergeben sich damit die Quotienten:

$$- h^2 = \sigma_a^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_e^2)$$

$$- l^2 = \sigma_{ml}^2 / (\sigma_a^2 + \sigma_{ml}^2 + \sigma_e^2)$$

4.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung zeigt Tabelle 4. Einzig für das Merkmal Fettgehalt ergibt sich eine Signifikanz an der Grenze von 5% Irrtumswahrscheinlichkeit. Das Verhältnis der Varianz der maternalen Linie zur additiv-genetischen Varianz beträgt für den Fettgehalt 0,9%. Für die beiden Merkmale log-Zellzahl und Fett-Eiweiß-Quotient, für die sich keine Signifikanz der maternalen Linie ergibt, sind diese Relativzahlen allerdings mit 2,6% und 1,3% deutlich größer.

Tab. 4 Ergebnisse der Varianzkomponentenschätzung nach den allgemeinen Modellen [1] und [3] am Material von Kühen aus Testherden in Mecklenburg-Vorpommern

Merkmal	Modell	h^2	h^2	l^2	LRT-Wert	p-value
		Allgemeines Modell [1]	Allgemeines Modell [3]	Allgemeines Modell [3]		
Milchmenge (kg/Tag)	I	0,345	0,340	0,0018	0,92	0,3374
Fettgehalt (%)	I	0,423	0,415	0,0036	3,78	0,0519
Eiweißgehalt (%)	I	0,547	0,547	0*	0	1
Log(Zellzahl)	I	0,088	0,085	0,0020	1,78	0,1821
Fett-Eiweiß-Quotient	I	0,274	0,267	0,0031	2,84	0,0919
Rastzeit	II	0,093	0,093	0*	0	1

* – Schätzwert für maternale Linienvarianz = 0,0000

Mithilfe der Methoden der statistischen Modellierung konnte somit lediglich ein schwacher Effekt der maternalen Linie für den Fettgehalt nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe FREEMAN (SCHUTZ et al. 1992, 1993). Eine Ursache könnte darin liegen, dass von den insgesamt 6652 Mutterlinien lediglich 278 über den kompletten Zeitraum Mitglieder im Datenmaterial aufwiesen und ca. 20 % über einen Zeitraum von 10 Jahren vertreten waren.

5. Diskussion und Schlussfolgerungen

Die Schätzung der Bedeutung maternaler Linien im Sinne der statistischen Beschreibung von Effekten der mtDNA erbringt in der Literatur und auch in den eigenen Studien durchweg uneinheitliche und nur schwach bedeutsame Effekte. Am ehesten erscheint beim Milchrind das Merkmal Fettgehalt von der mtDNA beeinflusst zu sein. Die Schätzung des Einflusses der mtDNA ist mit großen Problemen behaftet, da epistatische Einflüsse und Dominanzeffekte zunächst negiert werden müssen. Gleiches gilt für Imprinting-Effekte, welche mit dem von NEUGEBAUER et al. (2010) vorgeschlagenem Modell modelliert werden können. Zukünftig wird es vermutlich möglich sein, Modelle zu entwickeln, welche sowohl Imprinting als auch Dominanz- und Epistasieeffekte und maternal-genetische Effekte neben den maternalen Linien berücksichtigen können. Es ist aber offenbar, dass derartige Modelle sehr hohe Anforderungen an die Datenstruktur und an den Umfang der Daten stellen werden.

Literatur

- ALI, T. E., and SCHAEFFER, L. R.: Accounting for covariances among test day milk yields in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 67, 637–644 (1987)
- BERRY, D. P., LONERGAN, P., BUTLER, S. T., CROMIE, A. R., FAIR, T., MOSSA, F., and EVANS, A. C. O.: Negative influence of high maternal milk production before and after conception on offspring survival and milk production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 91, 329–337, doi:10.3168/jds.2007-0438 (2008)
- BÖRNER, V., and REINSCH, N.: Gametic gene flow method accounts for genomic imprinting. *J. Anim. Breed. Genet.* 127, 215–229, doi:10.1111/j.1439-0388.2009.00837.x (2010)

- BOETTCHER, P. J., FREEMAN, A. E., JOHNSTON, S. D., SMITH, R. K., BEITZ, D. C., and McDANIEL, B. T.: Relationships between polymorphism for mitochondrial deoxyribonucleic acid and yield traits of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 79, 647–654 (1996)
- CASTRO, J., PICORNELL, A., and RAMON, M.: Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *Int. Microbiol.* 1, 327–332 (1998)
- DZAPO, V., SCHNARR, W., and WASSMUTH, R.: Mitochondrialer Stoffwechsel und heterotische Effekte beim Schwein: Ergebnisse eines reziproken Kreuzungsversuches. I. Reproduktionsleistung, Wachstumsintensität und Schlachtkörperqualität. *Z. Tierz. Züchtungsbiol.* 100, 109–123 (1983)
- DZAPO, V., and WASSMUTH, R.: Mitochondrialer Stoffwechsel und heterotische Effekte beim Schwein: Ergebnisse eines reziproken Kreuzungsversuches. II. Atmungsaktivität und oxydative Phosphorylierung in Herz-, Leber- und Hodenmitochondrien. *Z. Tierz. Züchtungsbiol.* 100, 280–295 (1983)
- DZAPO, V., and WASSMUTH, R.: Mitochondrialer Stoffwechsel und heterotische Effekte beim Schwein: Ergebnisse eines reziproken Kreuzungsversuches. III. Die Aktivitäten der Enzyme der Atmungskette in Leber-, Hoden- und Herzmitochondrien. *Z. Tierz. Züchtungsbiol.* 101, 112–130 (1984)
- GEORGES, M., CHALIER, C., and COCKETT, N.: The callipyge locus: evidence for the trans interaction of reciprocally imprinted genes. *Trends Genet.* 5, 248–52 (2003)
- HUTCHISON, C. A., NEWBOLD, J. E., POTTER, S., and EDGELL, M. H.: Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251, 536–538, doi:10.1038/251536a0 (1974)
- NEUGEBAUER, N., RÄDER, I., SCHILD, H. J., ZIMMER, D., and REINSCH, N.: Evidence for parent-of-origin effects on genetic variability of beef traits. *J. Anim. Sci.* 88, 523–532, doi:10.2527/jas.2009–2026 (2010)
- ONKEN, F.: Populationsgenetische Untersuchungen zur zytoplasmatischen Vererbung beim Milchrind. Diss. Göttingen (1993)
- ONKEN, F., and SWALVE, H. H.: Effect of maternal lineage on dairy production in herdbook data from East-Friesland. 44. Annual Meeting Europ. Assoc. Anim. Prod., Paper G2.8 (1993)
- ROKAS, A., LADOUKAKIS, E., and ZOUROS, E.: Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol. Evol.* 18/8, 411–417, doi: 10.1016/S0169-5347(03)00125-3 (2003)
- RON, M., YOFFE, O., and WELLER, J. L.: Sequence variation in D-loop mtDNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. *Anim. Genet.* 24, 183–186 (1993)
- SCHÜLER, L., QUELLMALZ, J., and SAAR, W.: Extrachromosomale Vererbung von Fruchtbarkeits- und Wachstumsmerkmalen – Eine Modelluntersuchung mit Labormäusen – Ergebnisse der Untersuchungen mit F1-Hybriden. *Arch. Tierz.* 36, 3/4, 443–450 (1993)
- SCHUTZ, M. M., FREEMAN, A. E., BEITZ, D. C., and MAYFIELD, J. E.: The importance of maternal lineage on milk yield traits of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75, 1331–1341 (1992)
- SCHUTZ, M. M., FREEMAN, A. E., LINDBERG, G. L., and BEITZ, D. C.: Effects of maternal lineages grouped by mitochondrial genotypes on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 76, 621–629 (1993)
- SCHUTZ, M. M., FREEMAN, A. E., LINDBERG, G. L., KOEHLER, C. M., and BEITZ, D. C.: The effect of mitochondrial DNA on milk production and health of dairy cattle. *Livestock Prod. Sci.* 37/3, 283–295 (1994)
- SOUTHWOOD, O. I., KENNEDY, B. W., MEYER, K., and GIBSON, J. P.: Estimation of additive maternal and cytoplasmic genetic variances in animal models. *J. Dairy Sci.* 72, 3006–3012 (1989)
- STEINBORN, R., SCHINOGL, P., ZAKHARTCHENKO, V., ACHMANN, R., SCHERNTHANER, W., STOJKOVIC, M., WOLF, E., MÜLLER, M., and BREM, G.: Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nature Genet.* 25, 255–257 (2000)
- TESS, M. W., REODECHA, C., and ROBISON, O. W.: Cytoplasmic genetic effects on pre-weaning growth and milk yield in Hereford cattle. *J. Anim. Sci.* 65, 675–684, doi:10.2134/jas1987.653675x (1987)
- WHITE, D. J., WOLFF, J. N., PIERSON, M., and GEMMELL, N. J.: Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol. Ecol.* 17, 4925–4942, doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03982.x (2008)

Prof. Dr. Hermann H. SWALVE
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Theodor-Lieser-Straße 11
06120 Halle (Saale)
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 345 5522320
Fax: +49 345 5527105
E-Mail: hermann.swalve@landw.uni-halle.de

Geist – Gehirn – Genom – Gesellschaft

Wie wurde ich zu der Person, die ich bin?

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung
vom 20. bis 22. September 2013 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 120, Nr. 405
Herausgegeben von Onur GÜNTÜRKÜN (Bochum) und
Jörg HACKER (Halle/Saale)
(2014, 252 Seiten, 54 Abbildungen, 1 Tabelle, 29,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3322-0)

Die Frage „Wie wurde ich zu der Person, die ich bin?“ betrifft jeden ganz unmittelbar. Der Band zeigt die Bedingungen, Prozesse und Einflussfaktoren auf, die uns in der Interaktion mit unserer Umwelt zu einzigartigen Individuen werden lassen. Er behandelt unser gegenwärtiges Wissen über die natürlichen und kulturellen Wurzeln menschlicher Individualität aus verschiedenen Perspektiven, die von der Humangenetik und Neurobiologie über die Psychologie und die Verhaltens- bzw. Kognitionswissenschaften bis hin zu Philosophie, Wissenschaftsgeschichte und Ethik reichen. In der Sicht der klassischen Bio- und Gesellschaftswissenschaften determiniert die im Genom des Menschen gespeicherte Information im Laufe der frühen Ontogenese den Aufbau des Gehirns, das so entstandene Gehirn schafft den Geist, und durch die Interaktion von Individuen entstehen gesellschaftliche Strukturen. Diese lineare Kausalitätskette ist aber nach unseren heutigen Erkenntnissen keineswegs vollständig. Gesellschaftliche Strukturen wirken auf das Denken von Individuen zurück, sodass sich Geist und Gesellschaft reziprok beeinflussen. Unser Denken beeinflusst auch unser Gehirn. Neuronale Prozesse wirken auf die Aktivitätsmuster des Genoms zurück. Genom und Gesellschaft interagieren. Geist und Genom stehen ebenfalls in einem Wechselspiel. Der Komplexität dieses Netzwerks aus Geist – Gehirn – Genom – Gesellschaft spürt der Band in vielen Facetten auf aktuellem Wissensstand nach.

Zebuines Kerngenom und taurine Mitochondrien: Admixtur von Nelore, der größten brasilianischen Rinderrasse

Johann SÖLKNER,¹ Ana M. PEREZ O'BRIEN,¹ Daniela HÖLLER,¹
Solomon A. BOISON,¹ Marco MILANESI,² Lorenzo BOMBA,²
Yuri T. UTSUNOMIYA,³ Roberto CARVALHEIRO,³ Haroldo H. R. NEVES,³
Marcos V. B. DA SILVA,⁴ Curtis P. VAN TASSELL,⁵ Tad S. SONSTEGARD,⁵
Gábor MÉSZÁROS,¹ Paolo AJMONE-MARSAN² und Jose Fernando GARCIA⁶

Zusammenfassung

Die Rinderwirtschaft ist ein bedeutender Erwerbszweig in Brasilien, und das Land ist aktuell der weltweit drittgrößte Exporteur von Rindfleisch. Mitte der 1950er bis Mitte der 1960er Jahre wurden Tausende von Zebus aus Indien importiert und die Fleischrasse Nelore (auch Nellore genannt) etabliert. Die Studie analysiert mit Methoden der Cluster-Analyse, implementiert in der Software „Admixture“, wie hoch der Anteil von indicinem und taurinem Erbgut in der aktuellen Nelore-Population ist. Als taurine Referenz werden die Rassen Angus, Fleckvieh, Hereford, Holstein Friesian, Limousin und Piedmontese verwendet, indicine Referenz sind ancestrale Nelore- und Gir-Tiere sowie die Rasse Brahman.

Abstract

The beef industry is a major employment industry in Brazil and the country is currently the world's third largest exporter of beef. From the mid-1950s to the mid-1960s, thousands of zebus were imported from India, establishing the meat breed Nelore (or Nellore). This study uses cluster analysis methods, implemented by the “Admixture” software, to analyze the proportion of indicine and taurine genetic material in the current Nelore population. Angus, Fleckvieh, Hereford, Holstein Friesian, Limousin and Piedmontese cattle breeds are used as taurine references. Ancestral Nelore and Gir animals and the Brahman cattle breed serve as the indicine references.

1. Einleitung

Die Rinderwirtschaft ist ein bedeutender Erwerbszweig in Brasilien, und das Land ist aktuell der weltweit drittgrößte Exporteur von Rindfleisch, nach Indien und Australien. Rinder kamen mit der Kolonialisierung vor rund 400 Jahren aus dem Süden Europas nach Brasilien. Die

1 Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), Department Nachhaltige Agrarsysteme, Wien (Österreich).

2 Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Institute of Zootechnica and Biodiversity and Ancient DNA Research Center – BioDNA, Piacenza (Italia).

3 Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, Jaboticabal-SP (Brasil).

4 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora-MG (Brasil).

5 United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service, Bovine Functional Genomics Laboratory, Beltsville (MD, USA).

6 Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Araçatuba-SP (Brasil).

europäischen Typen von Rindern, welche der Subspezies *Bos taurus taurus* angehören, sind nicht angepasst an das in großen Teilen Brasiliens vorherrschende tropische Klima. Seit dem späten 19. Jahrhundert liefen Versuche, Zebu-Rinder der Subspezies *Bos taurus indicus* aus Indien zu importieren. Mitte der 1950er bis Mitte der 1960er Jahre wurden Tausende von Zebus aus Indien importiert und die Fleischrasse Nelore (auch Nellore genannt) sowie die Milchrasse Gir (auch Gyr genannt) etabliert. Über 80 % der brasilianischen Rinderpopulation haben einen hohen Anteil an Zebu-Genen, aktuell gibt es mehr als 100 Millionen Nelore-Rinder.

Mehrere Nelore-Zuchtprogramme etablieren aktuell die genomische Selektion als Zuchtmethode und genotypisieren dafür große Zahlen von Tieren mit dem Bovinen *High-density*-SNP-Chip (BovineHD Genotyping BeadChip, Illumina), welcher Information für 777 000 genetische Marker pro Tier liefert. In der vorliegenden Studie untersuchen wir mit Methoden der Cluster-Analyse, implementiert in der Software „Admixture“, wie hoch der Anteil von indicinem und taurinem Erbgut in der aktuellen Nelore-Population ist. Als taurine Referenz werden die Rassen Angus, Fleckvieh, Hereford, Holstein Friesian, Limousin und Piedmontese verwendet, indicine Referenz sind ancestrale Nelore- und Gir-Tiere sowie die Rasse Brahman.

2. Material und Methoden

2.1 Beschreibung der Rasse Nelore

Nelore stammt von der indischen Rasse Ongole ab und hat ihren Namen nach der Provinz Nellore im Bundesstaat Andhra Pradesh, von der aus die ersten Exporte nach Brasilien stattfanden. Rund 7000 Tiere wurden insgesamt importiert (VOZZI et al. 2007), die Ausbreitung der Rasse erfolgte durch Verdrängungskreuzung mit lokalen taurinen Creole-Rindern. Der Name der Rasse wurde erstmals 1868 erwähnt; ein Herdebuch und die dazu gehörigen Regelungen zur Zucht wurden 1838 etabliert (FLECHA 1997, ACNB 2006, DANI et al. 2008).

Nelore-Rinder haben wie alle anderen Zebus einen Schulterhöcker, haben lange Beine und für Zebus sehr kurze und stehende Ohren. Die Haut ist sehr dunkel, meist schwarz, das Fell ist einheitlich sehr hell (weiß oder hellgrau), und die Ohren sind zebu-untypisch klein und aufrecht. Die Rasse ist robust, hitzeresistent und viel weniger anfällig gegenüber durch Zecken übertragenen Parasiten. Diese Eigenschaften sowie rasches Wachstum in der Jugend und ein guter Mutterinstinkt haben Nelore zur mit Abstand am weitesten verbreiteten Rinderrasse Brasiliens werden lassen (FLECHA 1997).

Aktuell gibt es zwei konkurrierende Zuchtsysteme: Die Pedigree-Züchter legen größten Wert auf rein indische Abstammung, dokumentiert durch den Pedigree; die Produktionszüchter legen Wert auf sehr gute Fleischleistung und sind weniger streng bezüglich der indischen Abstammung.

2.2 Genotyp-Daten

Extrahierte DNA wurde mit dem Illumina BovineHD Genotyping BeadChip (Illumina, 2012) mit insgesamt 777 962 (777k) Single-Nucleotide-Polymorphismus-Markern (SNPs) getestet.

Dieser Chip beinhaltet SNPs aller 30 bovinen Chromosomenpaare sowie auch 314 Marker der mitochondrialen (mt) DNA.

Das ZGC (*Zebu Genomic Consortium*) aus Brasilien und das *Bovine HapMap Project* des USDA (*United States Department of Agriculture*) stellten die Genotypen-Daten von 706 Tieren zur Verfügung. Die Rasse Nelore wurde in drei Gruppen unterteilt: ancestrale Nelore (ANL, 21 Tiere), von Importen aus Indien, und zwei Gruppen von „jungem“ Nelore, Pedigree-Typ (YNLped, 148) und Produktions-Typ (YNLProd, 304).

Als taurine Referenzpopulationen wurden Angus (ANG, 30), Fleckvieh (FLV, 20), Hereford (HFD, 27), Holstein (HOL, 30), Limousin (LIM, 30) und Piedmontese (PMT, 24) herangezogen, weitere indicine Referenzpopulationen neben ancestraler Nelore waren Gir (GIR, 30) und Brahman (BRA, 30). Von der Rasse Brahman ist bekannt, dass es bei ihrer Entwicklung in den USA einen nicht unwesentlichen Beitrag tauriner Herkunft gab.

Nach Genotyp-Qualitätskontrolle mit Plink 1,07 (PURCELL et al. 2007) verblieben 704 Tiere mit 706017 autosomalen SNPs, 693 Tiere mit 98 Y-chromosomal SNPs und 703 Tiere mit 27 mitochondrialen SNPs zur Analyse. Eine detaillierte Beschreibung der Schritte der Qualitätskontrolle findet sich bei HÖLLER (2013). Der größte Teil der 314 mitochondrialen SNPs am Chip waren monomorph für den gesamten Datensatz.

2.3 Genetische Analysen

Die autosomalen SNPs wurden einer Admixture-Analyse mit der Software Admixture 2.1 (ALEXANDER et al. 2009) unterzogen. Die Software verwendet das bei dieser Art von Analysen häufig angewandte Hidden-Markov-Modell (HMM) der Cluster-Analyse. Die vorzuziehende Anzahl der ancestralen Populationen wurde von 2 bis 9 variiert, der Anteil jeder ancestralen Population im Genom jedes Individuums wird mit dem HMM-Algorithmus ermittelt. Admixture-Graphen geben Auskunft über die anteilige Zugehörigkeit jedes Individuums zu einer oder mehreren ancestralen Populationen. Für mitochondriale und Y-chromosomale SNPs wurden Haplotypen-Analysen mit der Software fastPHASE v1.2 (SCHEET et al. 2006) durchgeführt. Hier wurde nach in der jeweiligen Rasse bzw. Subspezies dominanten Haplotypen gesucht.

3. Ergebnisse

3.1 Autosomales Genom

Die Analyse der Admixture des Autosoms mit zwei ancestralen Populationen zeigt eine sehr klare Trennung von taurinen und indicinen Populationen (Abb. 1). Die aktuellen Nelore-Populationen (Produktions- und Pedigree-Typen) sind fast ausschließlich indicin, der durchschnittliche Anteil an taurinem Erbgut ist deutlich unter 1%. Brahman-Tiere zeigen einen deutlich höheren Anteil an taurinem Erbgut (13%), und auch Gir-Tiere sind aufgrund der vorliegenden Analyse weniger rein indicin als Nelore (4% taurin).

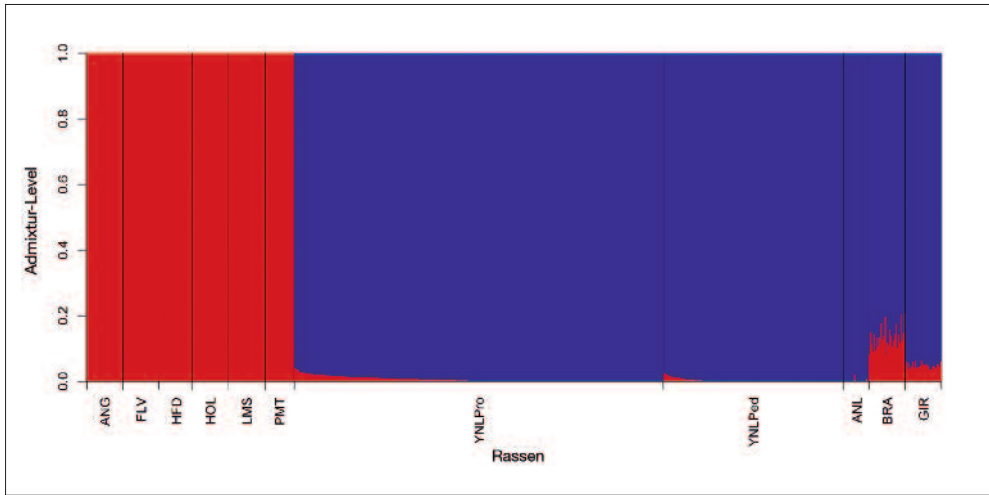


Abb. 1 Genomweite Admixture bei zwei ancestralen Populationen. Rassen: Angus (ANG), Fleckvieh (FLV), Hereford (HFD), Holstein (HOL), Limousin (LMS) und Piedmontese (PMT), aktuelle Nelore Produktionstyp (YNLpro) und Pedigree-Typ (YNLped), ancestrale Nelore (ANL), Brahman (BRA), Gir (GIR). Rote Farbe indiziert taurine, blaue Farbe indicine Abstammung.

Bei Vorgabe von 9 ancestralen Populationen (Abb. 2) ergibt sich kein klares Bild. Fleckvieh, Limousin und Piedmontese erscheinen in einem Cluster, Brahman und Gir in einem anderen. Die Tiere der Rasse Nelore werden nicht eindeutig zugeordnet, sondern zeigen 4 Abstammungen, die allerdings privat für die Rasse sind.

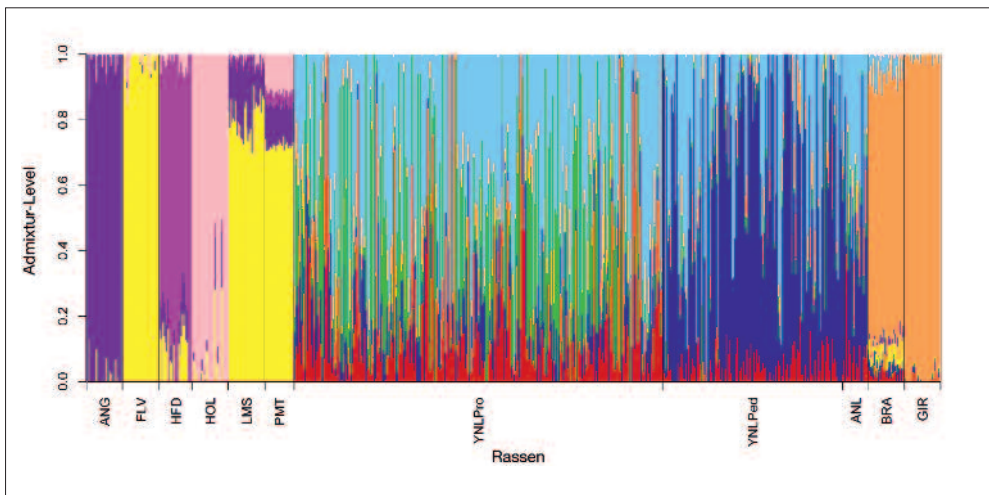


Abb. 2 Genomweite Admixture bei neun ancestralen Populationen. Für Erklärung der Abkürzungen siehe Abb. 1.

3.2 Y-chromosomale und mitochondriale Genome

Die Admixtur-Analyse des Y-chromosomalen Genoms zeigt eine klare Zuordnung der aktuellen Nelore-Population zum indicinen Typ. Die Auswertung des mitochondrialen Genoms zeigt keine klare Trennung (für Details zu beiden Analysen siehe HÖLLER 2013). Eine Haplotypen-Analyse, wie sie üblicherweise für Marker dieser beiden Genome vorgenommen wird, zeigt für die auf 9 polymorphen SNPs basierenden Y-chromosomalen Haplotypen keine klare Trennung von taurinen und indicinen Typen (Tab. 1). Es zeigt sich ein dominanter Haplotyp, der bei Nelore zu 100 % vorkommt, aber auch bei Holstein monomorph und bei den übrigen taurinen Rassen dominant ist. Lediglich Fleckvieh und Piedmontese zeigen private Haplotypen in nennenswerter Frequenz.

Tab. 1 Frequenzen Y-chromosomaler Haplotypen. Die Hintergrundfarbe zeigt die höchste und zweithöchste (wenn > 0,10) Frequenz eines Haplotyps innerhalb einer Rasse in gelb bzw blau. Haplotypen, die für eine Rasse privat sind, werden in orange angezeigt.

Hap-ID	Rassen											
	ANG	FLV	HFD	HOL	LMS	PMT	ANL	BRA	GIR	YNL _{pro}	YNL _{ped}	
1	0,964	0,600	0,852	1,000	0,933	0,417	1,000	0,864	0,897	1,000	1,000	
2			0,148		0,067	0,333		0,136	0,103			
3		0,400										
4						0,250						
5	0,036											

Die Haplotypenanalyse der 27 mitochondrialen SNPs (Tab. 2) zeigt mit insgesamt 15 Haplotypen eine größere Variabilität. Zehn dieser Haplotypen sind allerdings privat für eine Rasse und kommen bis auf eine Ausnahme in jeweils einer Kopie vor. Der dominante Haplotyp hat eine Frequenz von > 50 % in allen Rassen, der zweithäufigste Haplotyp kommt ausschließlich in indicinen Rassen vor. Bei der sicher unverfälschten Stichprobe der ancestralen Nelore beträgt die Frequenz 40,3 %, bei aktuellen Nelore lediglich 1,3 % (Nelore-Produktion) bzw. 8,5 % (Nelore-Pedigree). Die im Vergleich zu ancestralen Nelore deutlich niedrigere Frequenz dieses Haplotyps deutet auf taurine Mutterlinien hin.

Tab. 2 Frequenzen mitochondrialer Haplotypen. Die Hintergrundfarbe zeigt die höchste und zweithöchste (wenn > 0,10) Frequenz eines Haplotyps innerhalb einer Rasse in gelb bzw blau. Haplotypen, die für eine Rasse privat sind, werden in orange angezeigt.

Hap-ID	Rassen											
	ANG	FLV	HFD	HOL	LMS	PMT	ANL	BRA	GIR	YNL _{pro}	YNL _{ped}	
1	0,833	0,833	0,962	0,899	0,900	1,000	0,545	0,632	0,793	0,982	0,911	
2			0,038	0,033			0,403	0,167	0,207	0,013	0,085	
3	0,033	0,033		0,033	0,033			0,101				
4		0,033		0,033								
5	0,067											
6								0,067				
7					0,033							
8					0,033							
9	0,033											
10	0,033											
11									0,033			
12							0,047					
13		0,033										
14		0,033										
15		0,033										

4. Diskussion und Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse zeigen, dass das autosomale Genom der Chromosomen 1–29 der aktuellen Nelore-Population zu mehr als 99 % indicines Erbgut enthält. Die Variation ist gering, der größte Anteil an taurinem Erbgut in einem Einzeltier beträgt rund 5 %. Dies ist mit einer konsequenten Verdrängungskreuzung mit Einsatz rein indiciner Vätertiere gut vereinbar. Die Analyse der im *High-density*-Chip ebenfalls vorhandenen Marker aus mitochondrialer DNA gibt Hinweise zur Vererbung entlang der maternalen Ahnenlinien. Insgesamt waren 27 der über 300 mitochondrialen SNPs informativ. Die Analyse von Haplotypen ergibt allerdings keine vollständige Trennung von taurinen und indicinen Haplotypen, der bei den taurinen Rassen dominante Haplotyp findet sich auch bei rund 55 % den ancestralen Nelore-Tiere. Der mit 40 % zweithäufigste Haplotyp bei ancestralen Nelore findet sich jedoch kaum in der aktuellen Nelore-Population. Eine konventionelle Analyse durch Sequenzierung des mitochondrialen Genoms oder des D-Loop (UTSUNOMIYA et al. 2014) wäre wohl aussagekräftiger als die vorliegende Analyse von mtDNA-SNPs aus dem bovinen *High-density*-SNP-Chip. Die Analyse von 9 informativen Y-chromosomal SNPs indiziert keine klare Trennung der Subspezies.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der SNP-Analysen die Zuchtpraxis einer äußerst konsequenten Verdrängung von taurinen Genanteilen aus der Rasse Nelore in einem

Zeitraum von rund 60 Jahren. Dass sich hier praktisch kein Unterschied zwischen den Pedigree- und Produktionspopulationen von Nelore zeigt, ist für die brasilianische Züchtergemeinschaft überraschend und hoch relevant (PEREZ-O'BRIEN et al. 2015). Die Analyse der autosomalen Admixtur aus SNP-Chip-Daten ist sehr nützlich zur Klärung individueller Kreuzungslevels in Nutztierpopulationen (FLORI et al. 2012, FRKONJA et al. 2012).

Literatur

- ACNB: A Raça: Histórico. Associação dos Criadores de Nelore do Brasil. (2006)
<http://www.nelore.org.br/Raca/Historico> visited on 2013-11-24
- ALEXANDER D. H., NOVEMBRE, J., and LANGE, K.: Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Gen. Res.* 19, 1655-1664 (2009)
- DANI, M. A. C., HEINEMAN, M. B., and DANI, S. U.: Brazilian Nelore cattle: a melting pot unfolded by molecular genetics. *Genet. Mol. Res.* 7, 1127–1137 (2008)
- FLECHA, J. P.: Nelore. Oklahoma State University, Department of Animal Science, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. (1997)
<http://www.ansi.okstate.edu/breeds/cattle/nelore/> visited on 2013-09-29
- FLORI, L., GONZATTI, M. I., THEVENON, S., CHANTAL, I., PINTO, J., BERTHIER, D., ASO, P. M., and GAUTIER, M.: A quasi-exclusive European ancestry in the Senepol Tropical Cattle Breed highlights the importance of the slick locus in tropical adaptation. *PLOS ONE* 7, 5 (2012)
- FRKONJA, A., GREDLER, B., SCHNYDER, U., CURIK, I., and SÖLKNER, J.: Prediction of breed composition in an admixed cattle population. *Anim. Genet.* 43, 696–703 (2012)
- HÖLLER, D.: Assessing Taurine Introgression in the Current Brazilian Nelore Cattle Population. Master Thesis, Universität für Bodenkultur Wien (2013)
- PEREZ O'BRIEN, A. M., et al.: Low levels of taurine introgression in the current Brazilian Nelore and Gir indicine cattle populations. *Genet. Sel. Evol.* 47, 1–7 (2015)
- PURCELL, S., NEALE, B., TODD-BROWN, K., THOMAS, L., FERREIRA, M. A. R., BENDER, D., MALLER, J., SKLAR, P., BAKER, P. I. W. DE, DALY, M. J., and SHAM, P. C.: PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Amer. J. Hum. Genet.* 81, 559-575 (2007)
- SCHEET P., and STEPHENS M.: A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: Applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *Amer. J. Hum. Genet.* 78, 629-644 (2006)
- UTSUNOMIYA, Y. T., BOMBA, L., LUCENTE, G., COLLI, L., NEGRINI, R., LENSTRA, J. A., ERHARDT, G., GARCIA, J. F., and AJMONE-MARSAN, P.: Revisiting AFLP fingerprinting for an unbiased assessment of genetic structure and differentiation of taurine and zebu cattle. *BMC Genet.* 15/1, 1 (2014)
- VOZZI, P. A., MARCONDES, C. R., BEZERRA, L. A. F., and LÔBO, R. B.: Pedigree analyses in the breeding program for Nelore cattle. *Genet. Mol. Res.* 29, 482-485 (2007)

Prof. Dr. Johann SÖLKNER
Universität für Bodenkultur Wien (BOKU)
Department Nachhaltige Agrarsysteme
Institut für Nutztierwissenschaften (NUWI)
Augasse 2–6
1090 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 47654 93201, 93231
E-Mail: johann.soelkner@boku.ac.at

Wahrnehmen und Steuern

Sensorsysteme in Biologie und Technik

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung
vom 19. bis 21. September 2014 in Rostock

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 122, Nr. 410

Herausgegeben von Jörg HACKER (Halle/Saale), Rudolf F. GUTHOFF (Rostock),

Gottfried SCHMALZ (Regensburg) und Eberhart ZRENNER (Tübingen)

(2015, 283 Seiten, 131 Abbildungen, 3 Tabellen, 29,95 Euro,

ISBN: 978-3-8047-3447-0)

Mensch und Tier sind für ihr Überleben in der Auseinandersetzung mit der sie umgebenden Umwelt auf die Wahrnehmung optischer, akustischer, olfaktorischer, gustatorischer und haptischer Eindrücke angewiesen. Mit ihren sensorischen Systemen können sie die vielfältigen chemischen und physikalischen Reize aufnehmen, die der Organismus verarbeitet und die schließlich das Verhalten und die Gefühlswelt beeinflussen. Für die Problematik der Sensorik und des Wahrnehmens des Menschen spielt die Begrenzung durch entsprechende Einschränkungen eine besondere Rolle. Diese kann durch die wissenschaftlichen und technischen Möglichkeiten über künstliche Sensorsysteme immer besser kompensiert werden. Schließlich kann sich wahrnehmendes Steuern vom Menschen gänzlich lösen und z. B. Robotern zugewiesen werden. Die Verbindung der Sinn- und Wahrnehmungsproblematik mit ästhetischen Fragestellungen und künstlerischen Herangehensweisen liefert ein weiteres interessantes Diskussionsfeld. Der Band behandelt auch die Themen „Biologische Kommunikation“, „Hören und Sehen“, „Sprache, Denken und Lernen“, „Medizintechnik, angewandte Biomechanik und Robotik“ sowie „Gesellschaft“.

MtDNA-Variabilität beim Noriker und Murinsulaner – Beispiele einer komplexen historischen Entwicklung in der Pferdezucht

Thomas DRUML,¹ Anamarija SMETKO,² Ino CURIK,³ Antun KOSTELIĆ,³
Arpad BOKOR⁴ und Vlatka ČUBRIĆ-ČURIK³

Zusammenfassung

Zahlreiche mtDNA-Studien beim Pferd haben bestätigt, dass die Entwicklungsstränge dieser Haustierspezies von der postglazialen Periode bis in die Neuzeit nicht linear verliefen. Das equine Haplotypennetzwerk ist demnach durch eine enorme Variabilität charakterisiert, die weder mit der geographischen Struktur noch mit dem Rassenspektrum korrespondiert. In dieser Arbeit hat die Rückverfolgung von Stutenfamilien bei Rassen mit tiefen Pedigrees (Noriker, Lipizzaner) gezeigt, dass auf der weiblichen Seite bedeutende Einbußen an maternaler Diversität zu verbuchen sind. Bei breit aufgestellten Landespferdezuchten mit autochthonem Hintergrund, wie dem Noriker, kann der Verlust an maternalen Linien mit 85 % quantifiziert werden. In der Gestütszucht, exemplarisch dargestellt am Lipizzaner, beläuft sich dieses Defizit auf 72 %. Die Ursachen dafür sind keineswegs zufällig, und historische Beispiele illustrieren, dass in erster Linie sozioökonomische Hintergründe für die wiederholt aufeinanderfolgende Umstellung der Stutengrundlage, und damit einhergehend auch für die Veränderung der Linien- bzw. Haplotypenstruktur verantwortlich sind. Der heute verbliebene Rest an maternaler Diversität (15 bis 28 %) stellt jenen Pool dar, der mittels zufällig gezogener mtDNA-Stichproben die Möglichkeit für Rückschlüsse auf die prädomestikale Haplotypenzusammensetzung der europäischen Pferdefauna bieten sollte. Die Auswirkungen der Umstrukturierung der maternalen Basis und des Verlustes von maternaler genetischer Diversität auf die Ergebnisse von mtDNA-basierenden Domestikationsstudien beim Pferd wurden bislang noch nicht diskutiert. In einem praktischen Beispiel – der Revitalisierung des Murinsulaners – wird demonstriert, dass Kennzahlen aus der Pedigreeanalyse und der mtDNA-Analyse ein wertvolles Werkzeug für die Konzeption eines Erhaltungszuchtprogramms sein können. Die Haplotypenanzahl korreliert beim Pferd eng mit den genealogischen Strukturen und darüber hinaus auch mit der Populationsgröße (das Verhältnis von aktuellen Stutenlinien zu mtDNA-Haplotypen liegt zwischen 0,31 und 0,69; die mittlere Stutenanzahl pro Familie beträgt 7,9 Pferde). Sind die vorhandenen mtDNA-Haplotypen in der Ausgangspopulation bekannt, so kann das Zuchtprogramm entsprechend geplant werden, um eine langfristige Entwicklung und Erhaltung einer Rasse zu optimieren.

Abstract

Numerous studies on horse mtDNA have confirmed that the development of this domestic species – from the post-glacial period to modern times – is not linear. The equine haplotype network is characterized by a high degree of variability that corresponds neither with geographic structure, nor with the breed spectrum. In this paper, the tracking of mare families in breeds with deep pedigrees (Noriker, Lipizzaner) shows that there is a substantial loss of maternal diversity on the female side. For broad-based local horse breeds with an autochthonous background, such as the Noriker, 85 % of the maternal lines are lost. In stud farm breeding, with the Lipizzaner as an example, this deficit is

1 Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Tierzucht und Genetik, Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Österreich.

2 Kroatische Landwirtschaftsagentur, Ilica 101, Zagreb, Kroatien.

3 Universität Zagreb, Agrarfakultät, Department für Nutztierwissenschaften, Svetosimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Kroatien.

4 Universität Kaposvár, Fakultät für Nutztierwissenschaften, 7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40, Ungarn.

72%. The causes of this are in no way coincidental, and historical examples show that socioeconomic factors are primarily responsible for the repeatedly successive conversion of the mare's lines and, thus, the change in haplotype structure. The maternal diversity remaining today (15 – 28%) represents the pool that should provide conclusions about the pre-domesticated haplotype composition of European horses through randomly collected mtDNA samples. The impact that the restructuring of the maternal lines and the loss of maternal genetic diversity have had on the results of mtDNA-based domestication studies of the horse has yet to be discussed. One practical example – the revitalization of the Murinsulaner horse – demonstrates that indicators from pedigree analysis and mtDNA analysis can be a valuable tool in designing a preservation breeding programme. The number of horse haplotypes corresponds closely with the genealogical structures and, additionally, population numbers (the proportion of current mare lines to mtDNA haplotypes is between 0.31 and 0.69; the average number of mares per family is 7.9 horses). When it is known which mtDNA haplotypes are present in the initial population, the breeding programme can be planned accordingly in order to optimize a breed's long-term development and preservation.

1. Einleitung

Der 247 Basenpaare lange D-Loop-Abschnitt der mitochondrialen DNA, zwischen der Position 1549 bis 1740 gelegen und erstmals bei XU und ARNASSON (1994) publiziert, stellt die Grundlage für zahlreiche phylogenetische Untersuchungen beim Pferd dar, die seit der Arbeit von VILA et al. (2001) veröffentlicht wurden. Die strikt matrilineare Vererbung, die fehlende Rekombination und die hohe Mutationsrate prädestinieren die mtDNA für die Rekonstruktion von maternalen stammesgeschichtlichen Abläufen. Vor allem die erhöhte Mutationsrate erlaubt eine feinere Kalibrierung der einzelnen molekularen Stutenlinien, welche eine Analyse der genetischen Varianz auch im Zeitfenster der Prähistorik ermöglicht. Aus diesen Gründen avancierten phylogenetische mtDNA-Studien zum Standardrepertoire der Domestikationsforschung und ergänzten die in erster Linie anatomisch orientierten Methoden der Archäozoologie.

Beim Pferd begann die intensive molekulare Domestikationsforschung mit der Publikation von JANSEN et al. (2002), die erstmals die hohe Variabilität der Haplotypenstruktur europäischer Pferderassen nachwies. Seit der Eröffnung dieses Forschungsfeldes haben sich die Publikationen zu diesem Thema vervielfacht. Vervielfacht hat sich auch die Anzahl an entdeckten Haplotypen, die zurzeit von JANSEN et al. (2002) mit 93 festgesetzt wurde, und die bis 2010 auf 274 gestiegen ist (CIESLAK et al. 2010).

Die komplexe Struktur des equinen Haplotypennetzwerkes ist durch den Wissens- und Datenzuwachs jedoch keineswegs eindeutiger geworden, im Gegenteil, es kann heute davon ausgegangen werden, dass die hohe maternale Diversität des Pferdes weder mit geographischen Strukturen noch mit den einzelnen Rassespektra korrespondiert (CIESLAK et al. 2010).

Anfang des 21. Jahrhunderts wurden zunehmend Methoden entwickelt und verfeinert, die eine Analyse der DNA archäologischer Knochenfunde ermöglichten. Im Zuge der Auseinandersetzung mit den immer komplexer werdenden Haplotypennetzwerken des Hauspferdes, versprachen sich die Wissenschaftler zusätzliche Informationen über das populationsgenetische Profil von Pferden vor der Domestikation, denn die Stammform des Pferdes gilt mit dem letzten russischen Tarpan seit 1883 als ausgestorben.

LEI et al. (2009) verglichen die modernen mtDNA-Linien chinesischer Pferderassen mit jenen von prähistorischen Pferden aus dem Zeitraum von 4000 bis 2000 v. Chr. und stellten dabei fest, dass sich die altertümlichen Linien den asiatischen Haupthaplotypgruppen zuordneten. Eine spanische Gruppe von Forschern (LIRA et al. 2010) konzentrierte sich

in ihren Studien ausschließlich auf die Iberische Halbinsel. Mit archäologischen iberischen Pferdefindungen aus der Stein- und Bronzezeit und aus dem Mittelalter sowie europaweit verteilten voreiszeitlichen Fundstücken und der DNA von 399 iberischen Pferden und 689 Pferden europäischer Rassen wurde die Rolle der Iberischen Halbinsel als Domestikationszentrum untersucht. Erstaunlicherweise gruppieren sich die iberischen bronze- und steinzeitlichen Sequenzen zu einer gemeinsamen Haupthaplotypgruppe, die sich heute ausschließlich aus modernen iberischen Rassen rekrutiert. Die mittelalterlichen Sequenzen hingegen ordneten sich in einen sehr großen, in Europa weit verbreiteten Cluster (D1; JANSEN et al. 2002) ein. Letztendlich ist eine deutsche Forschergruppe vom Max-Planck-Institut (CIESLAK et al. 2010) der Frage nachgegangen, ob die Wildpferdefauna vor der Domestikation ähnlich heterogen war wie die heutige moderne Pferdepopulation. In dieser bis dato größten Studie (Sequenzen von 207 archäologischen Pferdefindungen und von 1754 modernen autochthonen Pferden) konnte gezeigt werden, dass vor der Eiszeit mindestens 19 mtDNA-Linien existierten, von denen sechs bis heute überlebt haben. Während der Kupferzeit kam es zur Herausbildung mehrerer Pole, darunter sind die eurasische und die iberische Gruppe am bedeutendsten. In der Eisenzeit tauchten plötzlich neue mtDNA-Varianten auf – ein Zeichen für erfolgte Neudomestikationen. Insgesamt haben von 86 prähistorischen mtDNA-Linien 56 in unseren heutigen Pferden überlebt. Die derzeit 274 existierenden Haplotypen repräsentieren somit eine Variabilität, die zum Teil schon in der Vorzeit vorhanden war.

2. Domestikationsmodelle beim Pferd

Parallel zu den Phylogeniestudien haben sich verschiedene Modelle zur Erklärung des Ablaufes der Domestikation beim Pferd entwickelt, wobei der monophyletische Ansatz mit den ersten mtDNA-Analysen revidiert werden konnte.

Aufgrund des archäologischen Befundes wurden zwei Inselmodelle als wahrscheinlichste Szenarien des Domestikationsvorganges herangezogen.⁵ Anhand eines interglazialen Inselmodells, ein Ansatz der aus der Vegetationsökologie entlehnt ist (WIDMER und LEXER 2001), versuchten WARMUTH et al. (2011) mittels autosomaler Diversitätskennzahlen von einzelnen autochthonen europäischen Pferderassen die Identifizierung europäischer Domestikationszentren. Unter der Annahme, dass innerhalb eines glazialen Refugialraumes und späteren Domestikationszentrums die genetische Variabilität signifikant höher ist als in entfernteren Gebieten, wo das Pferd später angesiedelt wurde, haben die Autoren 12 Mikrosatelliten-Marker von 1100 Stichproben aus 24 europäischen Lokalpferderassen untersucht. Die Heterozygotie und die erwartete Anzahl an Allelen von 12 Mikrosatellitenmarkern wurden mit einer geographischen Distanzmatrix abgeglichen, um den strukturellen Verlauf dieser Kennzahlen quer über den europäischen Kontinent zu rekonstruieren. Die Autoren postulierten einen direkten Zusammenhang der hohen genetischen Diversität auf der Iberischen Halbinsel und entlang der Kaspischen See mit der Vegetationsstruktur vor 6000 Jahren. Ob dieses Ergebnis nicht etwas zu weit gegriffen ist und nicht eher die landwirtschaftliche Produktionssituation des 20. Jahrhunderts widerspiegelt, wurde in dieser Arbeit nicht diskutiert. Denn

⁵ Vgl. LISTER et al. 1998, CLUTTON-BROOK 1999.

in Zentraleuropa, welches laut Studie ein Diversitätsdefizit zeigt, wurden ausschließlich französische, deutsche, österreichische und kroatische Kaltblutpferderassen miteinbezogen. Diese Pferderassen waren am frappantesten von der Umstrukturierung und Mechanisierung der Landwirtschaft, die ab dem Zweiten Weltkrieg ihren Höhepunkt erreichte, betroffen. Das beobachtete Diversitätsdefizit ist hier durch den genetischen Flaschenhals und den damit verbundenen „Founder-Effekt“ bedingt, und nicht durch prähistorische Migrationsereignisse. DRUML et al. (2006) konnten einen Heterozygotieverlauf bei 12 mitteleuropäischen Kaltblutpferderassen, der von Südeuropa nach Nordeuropa abnimmt, nachweisen. Die Ursache dafür sind die unterschiedlich intensiven Formen der Landnutzung in den einzelnen Zuchtgebieten. In Mittel- und Norddeutschland herrschten intensive landwirtschaftliche Produktionsformen mit Acker- und Futtermittelanbau vor. Das Arbeitspferd, nachdem es durch die Maschinen verdrängt worden war, avancierte hier zu einem Konkurrenten des Ackerbaus. Aus diesem Grund war die genetische Erosion in den landwirtschaftlichen Gunstlagen wesentlich stärker (bis zu minus 99 %) als im Alpenvorland und Alpengebiet, wo die Kaltblutpferdezucht im Rahmen der extensiven Weidewirtschaft weiterhin kostengünstig betrieben werden konnte.

Um den komplizierten und komplexen historischen Sachverhalt europäischer Pferdezucht als „Störfaktor“ auszuschalten, hat sich eine jüngere Domestikationsstudie (WARMUTH et al. 2012) auf Landpferderassen des Eurasischen Kontinents beschränkt. Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels einer Simulation einzelne Domestikationstheorien und Szenarien zu überprüfen und nach der wahrscheinlichsten Variante zu suchen. Mit einer Mikrosatellitenanalyse von 322 autochthonen Pferden aus zwölf Gebieten von acht verschiedenen Ländern (von Litauen bis in die Mongolei) sollten frühe Domestikationsvorgänge in Eurasien nachgezeichnet werden. Die Allelprofile eurasischer Pferderassen zeigten deutlich, dass die erste Expansion von *Equus ferus* in Ost-Eurasien um 160000 v. Chr. ihren Ausgang nahm, ein Ergebnis, das sich mit paläobiologischen Erkenntnissen deckt. „Unser Simulationsszenario schlägt vor, dass die Erstdomestikation des Pferdes im westlichen Teil Eurasiens (Kasachstan) stattfand, und dass sich die neu entstandenen Hauspferdeherden bei ihrer Ausbreitung permanent mit anderen Wildpferdeherden vermischten.“⁶ Dieser ständige Genfluss von Wildpferdeherden, der durch die weitere Ausbreitung des Hauspferdes immer neue Wildpferdepopulationen mit einbezog, wird für die hohe matrilineare Diversität bei unseren modernen Pferden verantwortlich gemacht. Als Grund für diese Einbürgerung neuer Wildpferdestuten wird die unzureichende Reproduktionsrate innerhalb neu domestizierter Herden angegeben. Mit diesen Neuzufängen konnten die Herden zahlenmäßig konstant gehalten bzw. vergrößert werden.

Der Einfluss von Wildpferden beim domestizierten Pferd wird in der „jüngeren“ molekulargenetisch gestützten Domestikationsforschung aufgrund fehlenden und in die Diskussion nicht miteinbezogenen Quellenstudiums weit unterschätzt. Dieser Genfluss ist nicht ausschließlich auf die Vorgeschichte beschränkt, sondern war selbst in Mitteleuropa bis in das 17. Jahrhundert Teil praktizierter Pferdezucht (vgl. Tab. 1 und 2).

6 WARMUTH et al. 2012, S. 8202.

Tab. 1 Die ersten frühen Erwähnungen von Wildpferden in altertümlichen und frühen Neuzeitlichen deutschsprachigen Quellen (nach ANTONIUS 1942)

Quelle	um	Art	Ort	Ende
Varro	184 v. C.	Wildpferde	Spanien	
Strabo	10 n. C.	Wildpferde	Alpen, Spanien	
Plinius d. J.	110 n. C.	Wildpferde	Norden Germaniens	
Venantius Fortunatus	600 n. C.	Wildpferde	Ardennen, Vogesen	
Isidor von Sevilla	636 n. C.	Wildpferde	Spanien	
Albertus Magnus	1260	Wildpferde	Deutschland, Preußen	
Albert von Hohenzollern	1490–1568	Wildpferde	Preußen	1650
Elisaeus Rößlin	1590	Wildpferde	Vogesen	1800
Dominik Roos um 1890	um 1600	Wilde Pferde	Elsass, Selestad, Vogesen	um 1850
Kaiserslauten (Stadt)	1616	Wildpferde	Wildpferdeschützen von der Stadt angestellt	

Tab. 2 Wildpferderefugien im deutschen Raum (nach ANTONIUS 1942)

Wildpferderefugien	Zeit
Duisburger Urwald, Jagdgebiet	1431, erste Erwähnung, 260 Wildpferde bei der letzten Jagd 1814 gefangen
Emscher Bruch, Gemeinschaftsbesitz	bis 1830, danach aufgrund Bodenreform die letzten 100 Stück versteigert
Merfelder Bruch (Dülmen)	1316, Ende 1845 Bodenreform, 158 Stück verblieben, 1908 35 vorhanden
Davert, Urwald südlich von Münster	1339, Ende der wilden Herden um 1825
Westfalen, Amsberger Wald	1160, Übergabe der wilden Stuten des Bischofs von Paderborn an die Zisterzienser

Die Sequenzierung des Pferdegenoms und die Erstellung der ersten equinen SNP-Map haben gezeigt, dass die genetischen Engpässe im und vor dem Zeitalter der Domestikation relativ moderat waren (WADE et al. 2009). Das Koppelungsungleichgewicht liegt in einem mittleren Ausmaß zwischen jenem von Menschen und Hunden, gleichzeitig kommen zahlreiche idente lange Haplotypen über Rassen hinweg vor. Diese Ergebnisse und die hohe Variabilität der mtDNA-Linien in rezenten und historischen Pferdepopulationen zeigen, dass die erstdomestizierten bzw. neudomestizierten Pferdeherden über ausreichend genetische Vielfalt verfügten. Wie der gesamte Prozess zeitlich, geographisch und kulturell abgelaufen ist, kann jedoch durch einen molekulargenetischen Ansatz alleine nicht geklärt werden.

Für den Zeitraum der historischen Zuchtgeschichte Europäischer Pferderassen konnte mit dem vorhandenen technischen Repertoire und den bislang publizierten Daten in der genetischen Forschung kein signifikantes Wissen gewonnen werden. Im Gegenteil, durch den „clash of cultures“ der 1990er Jahre (PLUCIENNIK 2006) – der diametralen Ausrichtung von Naturwissenschaften und Humanistischen Wissenschaften – wurde in der aktuellen tierzuchtwissenschaftlichen Forschung bereits erworbenes Wissen nicht weiter genutzt bzw. berücksichtigt. Mit der zunehmenden Verfügbarkeit moderner Sequenzierungstechnologien in der Molekulargenetik erwachte ein verstärktes Interesse an phylogenetischen Fragestellungen, wobei sich

die populationsgenetischen Disziplinen in zahlreichen Publikationen der Rekonstruktion genealogischer Beziehungen von verschiedenen Spezies und/oder Subpopulationen anhand von rezentem genetischem Material widmeten und die historischen bzw. prähistorischen Hintergründe zuerst außer Acht ließen. „Anstatt des Versuchs historische Hypothesen anhand von gegenwärtigen genetischen Mustern zu generieren und archäologische Daten in diese einzubetten, wäre es sinnvoller aus dem aktuellen archäologischen Material über Zeit und Raum hinweg Schlüsse zu ziehen und diese mit aktuellen genetischen Daten auf ihre Gültigkeit zu überprüfen.“⁷ In den letzten Jahren kam es damit relativ spät zu stärkeren Verschränkungen zwischen den geisteswissenschaftlichen und den genetischen Disziplinen, die sich wiederholt den genannten Fragestellungen unter Miteinbeziehung historischer und archäologischer Befunde widmeten.⁸

3. Repräsentivität von mtDNA-Stichproben

MtDNA-gestützte Domestikationsstudien beim Pferd basieren auf mehr oder weniger umfangreichen Stichproben europäischer, asiatischer und amerikanischer Pferderassen. Die strikt maternale Vererbung mitochondrialer DNA impliziert ein genealogisches System, dessen Aussagekraft stark von der Vollständigkeit der Datengrundlage abhängt. Da die Stammform des Pferdes ausgestorben ist, kann der Verlauf der Domestikationsgeschichte nur bedingt anhand archäologischer Proben nachgezeichnet werden. Die Variabilität, die wir heute im Hauspferd nachweisen können, illustriert nicht nur den vorgeschichtlichen maternalen Genpool, sondern sie ist auch das Abbild Jahrhunderte langer Kultur- und Tierzuchtgeschichte. Schränken wir diese aufgrund der ungeheuren Mobilität von reproduzierenden Tieren verzerrte Genealogie zusätzlich durch zufällige Stichprobenentnahmen ein, so kreieren wir damit einen methodischen Schwachpunkt in unseren phylogenetischen Analysen, der die historischen Gegebenheiten, denen diese Nutztierspezies unterliegt, nicht berücksichtigt.

Betrachten wir als Beispiel die österreichische Noriker-Population, eine österreichische Kaltblutpferderasse, die mehrere Wellen der Mechanisierung überstanden hat. Die heutige Zuchtpopulation umfasst ca. 4000 Stuten und 270 Hengste, insgesamt beläuft sich der aktuelle Bestand in Österreich auf 11000 Tiere. Das heute die Österreichische Republik umfassende Wirtschaftsgebiet war langfristig auf der Arbeitskraft von ca. 200000 Zugpferden aufgebaut. In den 1970er Jahren – dem Jahrzehnt der „Krise der Pferdezucht“ – ist diese österreichische Kaltblutpferdepopulation auf 4800 Pferde (minus 98 %) geschrumpft. Auf einer Pedigree-Analyse aus dem Jahr 2008 basierend (DRUML et al. 2009), wurden die maternalen Strukturen – die Stutenfamilien – ausgearbeitet (DRUML und GRILZ-SEGER 2013). Für die in dieser Studie definierte Referenzpopulation konnten 288 Stutenfamilien definiert werden, von denen zwei Drittel zwischen 1870 und 1930 entstanden bzw. dokumentiert sind. Insgesamt aber wurden in der Gründerpopulation 1899 verschiedene Gründerstuten nachgewiesen, deren Genealogie zwischen 1870 und 1986 abgerissen ist. Die heute beim Noriker existierenden 288 Stutenfamilien repräsentieren somit nur mehr 15 % der zu Beginn des 20. Jahrhunderts vorhandenen maternalen Varianz.

⁷ PINHASI et al. 2000, S. 55.

⁸ Vgl. LARSON et al. 2007, LIRA et al. 2010, LUDWIG et al. 2009.

Haben wir beim Noriker ein durchschnittliches Generationsäquivalent (GE) von 12,28 und ein Pedigree-Fenster bis in die 1920er Jahre, so lässt sich dieses Beispiel mit dem Lipizzaner-Stammbaum (GE = 15,22) noch weiter bis zu Beginn des 19. Jahrhunderts zurückverfolgen (DRUML und SÖLKNER 2011). Bei dieser Rasse sind im Zeitraum von 1740 bis 1910 198 unterschiedliche Gründerstuten dokumentiert. Von diesen konnten aber nur 56 Stuten ihre Linie bis in die Gegenwart führen. Der Verlust an maternaler Varianz beträgt in dieser Gestütszucht 72 % (vgl. Tab. 3).

Tab. 3 Maternale Diversitätskennzahlen

	Asturcon ^[1]	Mallorqui ^[1]	Lipizzaner ^[2]	Noriker ^[3]
Tier-Referenzpopulation	315	51	656	2808/31
Gründerstuten	50	18	198	1899
Stutenfamilien	35	14	56	288/26
Durchschnittliche Anzahl Stuten/Familie	9	3,6	10	9
Verlust an maternaler Variabilität	0,30	0,22	0,72	0,85
Anzahl mtDNA-Haplotypen	11	9	37	18
Anzahl Stutenfamilien pro Haplotyp	0,31	0,64	0,66	0,69
Generationsäquivalent	2,97	4,7	15,22	12,28
Inzucht	4,7 / –	4,7 / –	2,06 ^[4] / 10,08 ^[5]	1,21 ^[4] / 5,01 ^[5]

[1] ALVAREZ et al. 2012. [2] DRUML und SÖLKNER 2011, KAVAR et al. 1999. [3] DRUML et al. 2009, DRUML und GRILZ-SEGER 2013. [4] F für 5 Generationen. [5] F für alle Generationen.

Anhand dieser langen Pedigrees sehen wir, dass heute nur mehr zwischen 15 % und 28 % des maternalen Genpools vorhanden sind. Es stellt sich somit die Frage, ob mit diesem Material unter Zuhilfenahme des genealogischen mtDNA-Konzepts überhaupt ein Schluss auf prähistorische Ereignisse möglich sein kann?

Beim Lipizzaner, dessen Stutbuch im Jahr 1827 rekonstruiert und von da an fortgeführt wurde, ist im Jahr 2009 ein Pferdegrundbuch aus der Zeit vor den Napoleonischen Kriegen ausfindig gemacht worden. Hier sind 30 Stutenfamilien des Stammgestüts Lipizza registriert, die anhand dieser Quelle bis in das Jahr 1701 nachweisbar sind (GRILZ-SEGER und DRUML 2011). Nur vier dieser Familien (13 %) haben den Sprung in das 19. Jahrhundert überlebt und sind von da an als sogenannte Karster-Familien weitergeführt worden.

Dieser Umbruch in der Lipizzaner-Zucht war kein zufälliger „Bottleneck“, sondern eine bewusst züchterische Umorientierung. Einerseits wurde nach dem Wiener Kongress die gesamte Hopfferdezucht umgestellt, ein Prozess der bis 1827 andauerte. Andererseits wurden neue Zuchtziele und Nutzungsrichtungen für die Hopfferdezucht festgelegt. Das Zuchtziel barocker Tradition entsprach nicht mehr den Erfordernissen der Zeit, daher wurden sowohl der Stutenbestand als auch der Hengstpool teilweise ausgetauscht. Somit änderte sich das genealogische Profil der gesamten Rasse auf mtDNA-Niveau als auch auf dem Y-Chromosom. Ähnliche Prozesse sind natürlich auch in den Landespferdezuchten zu beobachten. Existierten in Österreich z. B. nach dem Zweiten Weltkrieg noch ca. 5000 Warmblutstuten altösterreichischen Gestütschlages (Furioso, Przedswit, Nonius, Gidran), wurden diese innerhalb von zwei Jahrzehnten durch Hannoveraner- und Holsteiner-Stuten und -Hengste ersetzt. Der heutige Anteil Altösterreichischen Warmbluts

an der gesamten österreichischen Warmblutpferdepopulation ist verschwindend klein und wird mit 28 Tieren, die mehr als 75 % Hannoveraner-, Holsteiner-Genanteile haben, beziffert. Das Resultat: ein komplett verändertes mtDNA-Profil der österreichischen Warmblutpferdepopulation. Ähnliche Prozesse ziehen sich durch die gesamte Geschichte der europäischen Pferdezucht und können je nach Quellenlage bis Mitte des 19. Jahrhunderts am Papier nachvollzogen werden.

Für die Nutzung der mtDNA als genealogische Information zur Auflösung historischer und prähistorischer Abläufe ergeben sich daher folgende Anforderungen:

- Pedigree-Studien: Quantifizierung der vorhandenen Stutenfamilien aus dem Pedigree.
- Historisches Quellenstudium: klären, welche Familien repräsentativ für die jeweilige Fragestellung sind.
- Typisierung: vollständige Erfassung maternaler Linien mit Hilfe des Pedigrees durch mtDNA-Proben.

Selbst wenn 72 % bis 85 % der maternalen Varianz aufgrund der jüngeren Zuchtgeschichte für mtDNA-Studien verloren sind, so sollte die verbliebene Variabilität so optimal wie möglich genutzt werden. Dies wiederum geschieht nur dann sinnvoll, wenn gründliche historische Quellenarbeit und der archäologische Wissenstand in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

4. Fallbeispiel Noriker und Murinsulaner

Der Murinsulaner, eine Lokalrasse, die ihren Namen von der Murinsel, einem Landstrich zwischen Drau und Mur, bezog, ist ein südöstlicher Ausläufer des Norikers. Sein Herkunftsgebiet erstreckt sich heute über Teile Sloweniens, Ungarns und Kroatiens. Aus diesem Grund existieren mehrere Bezeichnungen für diesen mittelschweren Arbeitsschlag: *Muraköszí ló* (ungarisch), *Medžimurje* (slowenisch), *Međimurje* (kroatisch), *Pinkafelder* oder *Murinsulaner* (deutsch). In Österreich gilt dieser Pferdeschlag seit dem Ersten Weltkrieg als ausgestorben, im SHS-Staat⁹ und der darauffolgenden Republik Jugoslawien wurde diese Rasse als leichtes und gängiges Kaltblut weitergezüchtet, in Ungarn legte man etwas mehr Wert auf Größe und Kaliber. Seit der letzten Mechanisierungswelle in der Landwirtschaft, welche Ungarn und Jugoslawien erst in den 1970ern voll erfasste, gingen die Bestandszahlen des Murinsulaners rasant zurück. Im Jahr 2009 wurde ein grenzüberschreitendes Projekt zur Revitalisierung dieser Pferderasse in die Wege geleitet. In Slowenien wurden die Pferde für das Erhaltungszuchtprogramm hauptsächlich anhand des Phänotyps selektiert, in Kroatien suchte man hingegen nach Nachfahren bekannter Murinsulaner-Stuten, und in Ungarn konnte auf eine Nukleusherde aus dem Órség-Nationalpark zurückgegriffen werden. Angesichts dieser Ausgangslage stellte sich die Frage, ob es möglich ist, den genetischen Hintergrund dieser drei Ausgangspopulationen (SLO11-Stuten, HUN24-Stuten, CRO27-Stuten) genauer zu strukturieren und deren Verwandtschaftsgrad mit dem österreichischen Noriker herzuleiten.

Im Sinne eines Phylogeniekonzeptes wurden von allen Murinsulanern sowie von einer 37 unverwandte Tiere umfassenden Stichprobe österreichischer Noriker das 247 bp lange Fragment des mtDNA-D-Loops sequenziert, um die genealogischen Zusammenhänge zwischen den Subpopulationen näher zu untersuchen (vgl. Tab. 4 und 5).

9 SHS-Staat – Staat der Slowenen, Kroaten und Serben (*Država Slovenaca, Hrvata i Srba*).

Tab. 4 Diversitätskennzahlen der untersuchten Murinsulaner-Populationen und der Vergleichspopulationen

Rasse/Population	N	Nh	Hdiv	Nukldiv	Nukl a	poly
Murinsulaner	62	26	0,947±0,011	0,023±0,007	5,554	25
Murinsulaner Kroatien	27	13	0,881±0,048	0,024±0,008	5,817	22
Murinsulaner Slowenien ¹⁰	11	10	0,943±0,040	0,018±0,008	4,267	15
Murinsulaner Ungarn	24	9	0,838±0,048	0,021±0,007	5,154	16
Noriker	37	18	0,963±0,015	0,023±0,008	5,437	20
Noriker Kärnten	27	15	0,965±0,022	0,021±0,008	5,009	17
Noriker Salzburg	10	7	0,944±0,070	0,028±0,013	6,667	17

N – Anzahl Pferde, Nh – Anzahl Haplotypen, Hdiv – Haplotypendiversität, Nukldiv – Nukleotiddiversität, Nukl a – Durchschnittliche Anzahl der Nukleotidunterschiede; poly – polymorphe Loci

Tab. 5 Verteilung der Haupthaplotypgruppen (nach JANSEN et al. 2002) beim Noriker und dem Murinsulaner

	Haplotypgruppen/Haplotypen ¹¹												
	N	A	D	C	F	Hap_19	Hap_12	Hap_45	Hap_16	B	E	G	H
Murinsulaner	62	0,24	0,21	0,16	0,21	0,15	–	0,02	0,02	–	–	–	–
Kroatien	27	0,26	0,04	0,19	0,19	0,33	–	–	–	–	–	–	–
Ungarn	24	0,21	0,42	0,13	0,25	–	–	–	–	–	–	–	–
Slowenien	11	0,27	0,18	0,18	0,18	–	–	0,09	0,09	–	–	–	–
Noriker	37	0,41	0,30	0,22	0,03	–	0,03	–	–	–	–	0,03	–
Kärnten	27	0,41	0,33	0,22	–	–	–	–	–	–	–	0,04	–
Salzburg	10	0,40	0,20	0,20	0,10	–	0,10	–	–	–	–	–	–

Insgesamt konnte beim Murinsulaner, einer zahlenmäßig stark dezimierten Restpopulation, eine große genetische Heterogenität festgestellt werden, die sich mit 26 Haplotypen innerhalb der 62 untersuchten Tiere manifestiert. Die 37 Noriker-Pferde zeigten 18 unterschiedliche Haplotypen und übertrafen dabei die genealogische Vielfalt des Murinsulaners. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Noriker-Stichproben selektiv nach Gesichtspunkten der genetischen Diversität gesammelt wurden und somit repräsentativ für die genetische Breite dieser zahlenmäßig großen Rasse sind. Die Haplotypenprofile der Murinsulaner-Subpopulationen zeigten spezifische Schwerpunkte: Neun der 26 Haplotypen kamen ausschließlich in der kroatischen Population vor, fünf waren typisch für die ungarische und sieben für die slowenische Zuchtherde. Die ungarischen und die kroatischen Pferde teilten sich drei Haplotypen, kroatische und slowenische sowie slowenische und ungarische Murinsulaner teilten sich je-

¹⁰ POTOČNIK et al. 2011.

¹¹ Haplotypen 19, 12, 45 und 16 konnten nicht eindeutig den Haupthaplotypgruppen zugeordnet werden.

weils zwei Haplotypen. In der gesamten untersuchten Stichprobe waren neun Haplotypen ausschließlich spezifisch für den Murinsulaner (fünf für die kroatische und vier für die slowenische Herde). Auf den Noriker kamen vier spezifische Haplotypen. Insbesondere die Kärntner Noriker-Population teilte sich neun Haplotypen mit dem Murinsulaner, ein Ergebnis, welches mit der Zuchtgeschichte beider Rassen übereinstimmt (vgl. Haplogruppenverteilung Tab. 5).

In Tabelle 3 ist der Zusammenhang zwischen genealogischer Struktur, Haplotypenstruktur und aktueller Populationsgröße dargestellt. In diesen Beispielen verschiedener Pferdezuchtregimes sind ca. 9 bis 10 Stuten pro Familie im Zuchteinsatz, ein Verhältnis, das sowohl in Landespferdezuchten als auch in Erhaltungszuchten mit beschränkter Populationsgröße auf Gestütsniveau festgestellt werden kann. Aufgrund dieser Verhältniszahlen – im Schnitt kommen auf einen Haplotyp 1,74 Stutenfamilien – können strukturelle Veränderungen bzw. Richtgrößen abgeleitet werden, die es erlauben, ein Erhaltungszuchtprogramm, das auf praktischen Erfahrungen beruht, zu etablieren. Mit den 26 beim Murinsulaner identifizierten Haplotypen könnten somit 22 Stutenfamilien bei der kroatischen, 15 Stutenfamilien bei der ungarischen und 17 Stutenfamilien bei der slowenischen Murinsulaner-Population, also insgesamt 44 neue Stutenfamilien aufgebaut werden. Unter Verwendung der herkömmlichen mitteleuropäischen Zuchtprogramme kann mit Hilfe der Familienzucht bei Konstanthaltung der Familiengrößen die genetische Diversität auf ein entsprechend breites Niveau gebracht werden, das auch langfristige, wie die Kennzahlen aus Tabelle 3 zeigen, gehalten werden kann.

5. Resümee

In den europäischen Pferderassen existieren signifikante „Bottlenecks“ auf der maternalen Seite, die in den zahlreichen Domestikations- und genetischen Diversitätsstudien nicht berücksichtigt worden sind. Mit Zuhilfenahme von tiefen und komplexen Pedigrees können diese maternalen genetischen Verluste für den Zeitraum von 1700 bis in die Gegenwart mit ca. 72 bis 85 % beziffert werden. Die verbliebenen 28 bis 15 % an maternaler Diversität bieten nur begrenzt Information, um Rückschlüsse auch auf die Zusammensetzung von prädomestikalen Pferdeherden zuzulassen. Diese maternalen „Bottlenecks“ waren nicht ausschließlich durch den Zufall bedingt, sondern auf die zwischen 1700 und 1970 erfolgten Umstrukturierungsmaßnahmen auf züchterischem und organisatorischem Gebiet zurückzuführen. Um die komplexe Domestikationsgeschichte des Pferdes mittels molekulargenetischer Informationen zu untersuchen, ist es notwendig, eine sorgfältige Auswahl an Tieren unter Miteinbeziehung der Rassen-, Zucht- und Wirtschaftsgeschichte der jeweiligen Populationen zu treffen. Dieser interdisziplinäre Ansatz, bei dem die historischen, tierzüchterischen, archäologischen und molekulargenetischen Wissenschaftsdisziplinen gleich gewichtet sind, erlaubt einerseits, komplexere Fragestellungen zu diesem erwiesenermaßen diffizilen Prozess zu stellen, und erhöht andererseits auch die Aussagekraft der einzelnen Ergebnisse und der resultierenden Szenarien. Im praktischen Sinne stellen die auf der Analyse von mtDNA basierenden Diversitätskennzahlen ein probates Hilfsmittel für die Konzeption von Erhaltungszuchtprogrammen dar. Fehlen die Pedigrees der Tiere, so kann mittels der mtDNA-Haplotypen und dem Faktor 1,74 eine maternale Struktur aufgebaut werden, die es erlaubt, eine nachhaltige und langfristige Zuchtplanung zu etablieren, wie es diverse Gestütszuchten und Landespferdezuchten über die Jahrzehnte und Jahrhunderte erfolgreich vorexerziert haben.

Literatur

- ALVAREZ, I., FERNANDEZ, I., LORENZO, I., PAYERAS, L., CUERVO, M., and GOYACHE, F.: Founder and present maternal diversity in two endangered Spanish horse breeds assessed via pedigree and mitochondrial DNA information. *J. Anim. Breed. Genet.* *129*, 271–279 (2012)
- ANTONIUS, O.: Von Wildpferden und Wildgestüten in Deutschland. *Odal (Goslar)* *11*, 30–37 (1942)
- CIESLAK, M., PRUVOST, M., BENECKE, N., HOFREITER, M., MORALES, A., REISSMANN, M., and LUDWIG, A.: Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLOS ONE* *5/12*, e15311 (2010)
- CLUTTON-BROCK, J.: *A Natural History of Domesticated Mammals*. Cambridge: Cambridge University Press 1999
- DRUML, T., BAUMUNG, R., and SÖLKNER, J.: Pedigree analysis in the Austrian Noriker draught horse: genetic diversity and the impact of breeding for coat colour on population structure. *J. Anim. Breed. Genet.* *126*, 348–356 (2009)
- DRUML, T., CURIK, I., BAUMUNG, R., ABERLE, K., DISTL, O., and SÖLKNER, J.: Individual-based assessment of population structure and admixture in Austrian, Croatian and German draught horses. *Heredity* *98*, 114–122 (2006)
- DRUML, T., and GRILZ-SEGER, G.: *Das Noriker Pferd. Band II*. Graz: Vehling 2013
- DRUML, T., und SÖLKNER, J.: *Der Lipizzaner Gen Pool*. In: BREM, G. (Hrsg.): *Der Lipizzaner im Spiegel der Wissenschaften*. S. 153–192. Wien: Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften 2011
- GRILZ-SEGER, G., und DRUML, T.: *Lipizzaner Hengststämme*. Graz: Vehling 2011
- JANSEN, T., FORSTER, P., LEVINE, M. A., OELKE, H., HURLES, M., RENFREW, C., WEBER, J., and OLEK, K.: Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *99*, 10905–10910 (2002)
- KAVAR, T., BREM, G., HABE, F., SÖLKNER, J., and DOVC, P.: History of Lipizzan maternal lines as revealed by mtDNA analysis. *Gen. Sel. Evol.* *34*, 1–14 (1999)
- LARSON, G., ALBARELLA, U., DOBNEY, K., ROWLEY-CONWY, P., SCHIBLER, J., TRESSET, A., VIGNE, J. D., EDWARDS, C. J., SCHLUMBAUM, A., DINU, A., BALACESCU, A., DOLMAN, G., TAGLIACOZZO, A., MANASERYAN, N., MIRACLE, P., VAN WIJNGAARDEN-BAKKER, L., MASSETI, M., BRADELY, D. G., and COOPER, A.: Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104/39*, 15276–15281 (2007)
- LEI, C. Z., SU, R., BOWER, M. A., EDWARDS, C. J., WANG, X. B., WEINING, S., LIU, L., XIE, W. M., LI, F., IU, R. Y., ZHANG, Y. S., ZHANG, C. M., and CHEN, H.: Multiple maternal origins of native modern and ancient horse populations in China. *Anim. Genet.* *40/6*, 933–944 (2009)
- LIRA, J., LINDERHOLM, A., OLARIA, C., BRANDSRTÖM DURLING, M., GILBERT, M. T., ELLEGREN, H., WILLERSLEV, E., LIDEN, K., ARSUAGA, J. L., and GÖTHERSTRÖM, A.: Ancient DNA reveals traces of Iberian Neolithic and Bronze Age lineages in modern Iberian horses. *Mol. Ecol.* *19/1*, 64–78 (2010)
- LISTER, A. M., KADWELL, M., KAAGAN, L. M., JORDAN, W. C., RICHARDS, M. B., and STANLEY, H. E.: Ancient and modern DNA in a study of horse domestication. *Anc. Biomol.* *2*, 267–280 (1998)
- LUDWIG, A., PRUVOST, M., REISSMANN, M., BENECKE, N., BROCKMANN, G. A., CASTANOS, P., CIESLAK, M., LIPPOLD, S., LLORENTE, L., MALASPINAS, A. S., SLATKIN, M., and HOFREITER, M.: Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science* *485*, doi: 10.1126/science.1172750 (2009)
- PINHASI, R., FOLEY, R., and MIRAZON LAHR, M.: Spatial and temporal patterns in the Mesolithic-Neolithic archaeological record of Europe. In: RENFREW, C., and BOYLE, K. (Eds.): *Achaeogenetics' DNA and the Population Prehistory of Europa*; pp. 45–56. Cambridge: McDonald Institute Monographs 2000
- PLUCIENNIK, M.: Clash of cultures? Archaeology and genetics. *Dokumenta Praehistorica (Ljubljana)* *XXXIII*, 39–49 (2006)
- POTOCNIK, K., SIMCIC, M., CIVIDINI, A., SALEHAR, A., MERACIC, M., RUS, J., KAVAR, T., and DOVC, P.: Medjimurje horse population in slovenia. *Acta Agriculturae Slovenica* *98*, 111–117 (2011)
- VILA, C., LEONARD, J. A., GÖTHERSTROM, A., MARKLUND, S., SANDBERG, K., LIDEN, K., WAYNE, R. K., and ELLEGREN, H.: Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* *291*, 474–477 (2001)
- WADE, C. M., GIULOTTO, E., SIGURDSSON, S., ZOLI, M., GNERRE, S., et al.: Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* *326/5954*, 865–867 (2009)
- WARMUTH, V., ERIKSSON, A., BOWER, M. A., BARKER, G., BARRETT, E., HANKS, B. K., LI, S., LOMITASHVILI, D., OCHIR-GORYAeva, M., SIZONO, G. V., SOYONOV, V., and MANCINA, A.: Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *109/21*, 8202–8206 (2012)
- WARMUTH, V., ERIKSSON, A., BOWER, M. A., CANON, J., COTHAN, G., DISTL, O., GLOWATZKI-MULLIS, M.-L., HUNT, H., LUÍS, C., DO MAR OOM, M., TUPAC YUPANQUI, I., ZABEK, T., and MANICA, A.: European domestic horses originated in two Holocene refugia. *PLOS ONE* *6/3*, e18194. doi:10.1371/journal.pone.0018194 (2011)
- WIDMER, A., and LEXER, C.: Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends Ecol. Evol.* *16/6*, 267–269 (2001)

Thomas Druml, Anamarija Smetko, Ino Curik, Antun Kostelić, Arpad Bokor und Vlatka Čubrić-Čurik

XU, X., and ARNASSON, U.: The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* 148, 357–362 (1994)

Dipl.-Ing. Dr. Thomas DRUML
Veterinärmedizinische Universität Wien
Institut für Tierzucht und Genetik
Veterinärplatz 1
1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250775634
E-Mail: Thomas.Druml@vetmeduni.ac.at

III. Geschlechtsbegrenzte Vererbung

Hinweise auf eine geschlechtsdifferenzierte genetische Architektur für ein komplexes Fitnessmerkmal bei *Drosophila melanogaster*

Henner SIMIANER,¹ Ulrike OBER,¹ Wen HUANG² und Trudy MACKAY²

Zusammenfassung

Während für eine Reihe von komplexen Merkmalen bei *Drosophila melanogaster* der Phänotyp erfolgreich auf Grundlage der gesamten Genomsequenz vorhergesagt werden kann, gelingt dies nicht beim komplex vererbten Fitnessmerkmal *Chill Coma Recovery*. Zur Aufklärung dieses überraschenden Phänomens wurden verschiedene additive und/oder epistatische Modelle mit Markerselektion an einem Datensatz von 176 genomweit sequenzierten und präzise phänotypisierten Linien des „*Drosophila melanogaster* Genetics Reference Panel“ angepasst und mittels einer systematischen *Leave-one-out*-Kreuzvalidierung bewertet. Hierbei kam für die Modellierung paarweiser epistatischer Interaktionen ein neu entwickeltes statistisches Modell zur Anwendung. Es zeigte sich, dass bei der Merkmalsrealisierung in männlichen und weiblichen Individuen sehr unterschiedliche genetische Architekturen zur besten Merkmalsvorhersage führten: Während bei männlichen Tieren ein einziges additives Hauptgen und sehr viele (ca. 3000) paarweise epistatische Interaktionen die optimale Vorhersage ermöglichten, gelang dies für weibliche Tiere am besten mit einem Modell, das auf mehreren (4–5) additiven Hauptgenen und ca. 30 paarweisen epistatischen Interaktionen beruhte. In beiden Geschlechtern wurde mit dem jeweils optimalen Modell eine für den Datenumfang bemerkenswerte Vorhersagegenauigkeit von > 0,4 erreicht. Aus der Studie am Modell *Drosophila melanogaster* kann die Frage abgeleitet werden, ob auch bei Nutztieren für komplexe Merkmale, die in beiden Geschlechtern realisiert werden (z. B. Wachstumsmerkmale) eine geschlechtsdifferenzierte genetische Merkmalsarchitektur gegeben ist. In diesem Fall wäre es erforderlich, Modelle in der genomischen Vorhersage geschlechtsspezifisch zu formulieren und anzupassen.

Abstract

While for several complex traits in *Drosophila melanogaster* it is possible to predict the phenotype based on the whole genome sequence, this is not possible for the complexly inherited fitness trait *Chill Coma Recovery*. To elucidate this surprising phenomenon, different additive and/or epistatic models with a marker-preselection were used in a data set of 176 genome-wide sequenced and precisely phenotyped lines of the “*Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel”. Pairwise interacting epistatic effects were modelled with a newly developed approach, and the accuracy of prediction was assessed with a *leave one out* cross-validation. Results showed that models with very different genetic trait architectures provided the most accurate prediction for the phenotypes expressed by males and females of the same inbred line: In male animals a single major gene and many (around 3000) pairwise interacting SNPs yielded the best prediction, while in females the best model comprised 4–5 main effects and just around 30 interacting SNP pairs. In both sexes, the optimal model yielded a prediction accuracy of > 0.4, respectively. From this study in *Drosophila melanogaster* one may derive the question, whether complex traits that are measured in both sexes of farm animals (e.g. growth traits) are affected by the same or different genetic architectures. In the latter case, sex-specific models for genomic prediction may yield an improved prediction accuracy.

1 Abteilung Tierzucht und Haustiergenetik, Department für Nutztierwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen, Bundesrepublik Deutschland.
2 Department of Genetics, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.

1. Einleitung

In einer früheren Studie (OBER et al. 2012) konnte gezeigt werden, dass für zwei komplexe Merkmale (*Starvation Resistance* und *Startle Response*) bei *Drosophila melanogaster* der Phänotyp erfolgreich auf Grundlage der gesamten Genomsequenz mit einem additiven Modell vorhergesagt werden kann. Für ein drittes Merkmal *Chill Coma Recovery* gelang dies nicht, obwohl die Heritabilität im weiteren Sinne für dieses Merkmal in einer ähnlichen Größenordnung lag wie bei den anderen Merkmalen. Im vorliegenden Beitrag wird beschrieben, dass auch für dieses Merkmal mit differenzierten genetischen Modellen eine erfolgreiche Vorhersage möglich ist und dass diese Modelle einen Einblick in eine geschlechtsdifferenzierte genetische Merkmalsarchitektur geben.

2. Material

Die Untersuchungen erfolgten an 176 Inzuchtlinien des *Drosophila Genetics Reference Panel* (DGRP, MACKAY et al. 2012). Alle Linien sind vollständig sequenziert, und es standen ca. 2,5 Millionen polymorphe Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs – engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*) zur Verfügung. In jeder Linie wurden etwa 100 männliche und 100 weibliche Individuen für das Merkmal *Chill Coma Recovery* (CCR) phänotypisiert. Hierbei werden adulte Individuen unter standardisierten Bedingungen zunächst eingefroren, und anschließend wird erfasst, wie lange es dauert, bis die Individuen sich wieder bewegen. Aus der Varianz zwischen Linien wurde für dieses Merkmal eine Heritabilität im weiteren Sinne von $H^2 = 0,37$ geschätzt.

3. Methoden und Ergebnisse

Unter Verwendung der in OBER et al. (2012) dargestellten Methoden wurde für das Merkmal CCR eine sequenzbasierte genomische Vorhersage mit dem Verfahren „Genomic BLUP“ (GBLUP, VAN RADEN 2008), getrennt für beide Geschlechter, durchgeführt. Die empirische Genauigkeit wurde mittels einer fünffachen Kreuzvalidierung mit 20 Wiederholungen anhand der Korrelation zwischen vorhergesagtem und gemessenem Phänotyp bestimmt. Diese Korrelation war über beide Geschlechter hinweg und nur für die männlichen Phänotypen negativ ($-0,04$ bzw. $-0,14$), nur für die weiblichen Phänotypen ergab sich eine leicht positive Korrelation ($0,05$). Insgesamt ist allerdings auf Grundlage dieser Ergebnisse festzustellen, dass mit dem additiven Modell eine Vorhersage der Phänotypen nicht möglich ist. Naheliegende Erklärungsmöglichkeiten, wie eine mögliche Schiefe der Verteilung oder der Einfluss von Ausreißern, konnten ausgeschlossen werden.

Den weiteren Analysen liegt das Verfahren der *Leave-one-out*-Kreuzvalidierung (LooKv) zu Grunde, es wurden also von den 176 Linien jeweils 175 Linien zur Modellentwicklung verwendet, um dann den Phänotyp der 176. Linie vorherzusagen. Dies wurde 176 Mal wiederholt, so dass jede Linie genau einmal vorhergesagt wurde und damit über alle Linien die Korrelation zwischen Vorhersage und Phänotyp berechnet werden konnte.

Dieses Verfahren erbrachte für das additive Modell keine anderen Ergebnisse. Während für den weiblichen Phänotyp die empirische Genauigkeit leicht positiv war ($0,059$), war für

den männlichen Phänotyp die Genauigkeit nicht zu bestimmen, weil in den meisten Wiederholungen der Schätzwert für die additiv-genetische Varianz 0 war.

DE LOS CAMPOS et al. (2013) haben gezeigt, dass für die Vorhersage von weitgehend unverwandten Individuen eine Variablenselektion vorteilhaft ist. Allerdings war es mit der vorliegenden SNP-Dichte nicht möglich, Standardverfahren aus der Tierzucht, wie z. B. BAYES B (MEUWISSEN et al. 2001), zu implementieren. Es wurde daher ein neues Verfahren entwickelt und angewandt, in dem nicht wie in GBLUP alle SNPs mit gleicher Gewichtung in die Schätzung eingingen, sondern SNPs mit hoher Relevanz für das Merkmal ausgewählt wurden. Nur diese wurden dann in die Schätzung einbezogen. Hierzu wurde zunächst der SNP-Datensatz reduziert, so dass nur die 1,87 Millionen SNPs verwendet wurden, deren Frequenz des seltenen Allels (*Minor Allele Frequency*, MAF) größer als 0,05 war. Danach wurde in jedem Trainingsdatensatz der LookV jeweils eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) mit einer „Single Marker Regression“ (ERBE et al. 2011) durchgeführt. Danach wurden in die Phänotypvorhersage mit dem GBLUP-Modell nur diejenigen SNPs einbezogen, deren Signifikanzniveau den Schwellenwert 10^x unterschritt, wobei x variiert wurde. Die Ergebnisse für die Vorhersagegenauigkeit in Abhängigkeit von dem gewählten Schwellenwert sind in Abbildung 1 dargestellt.

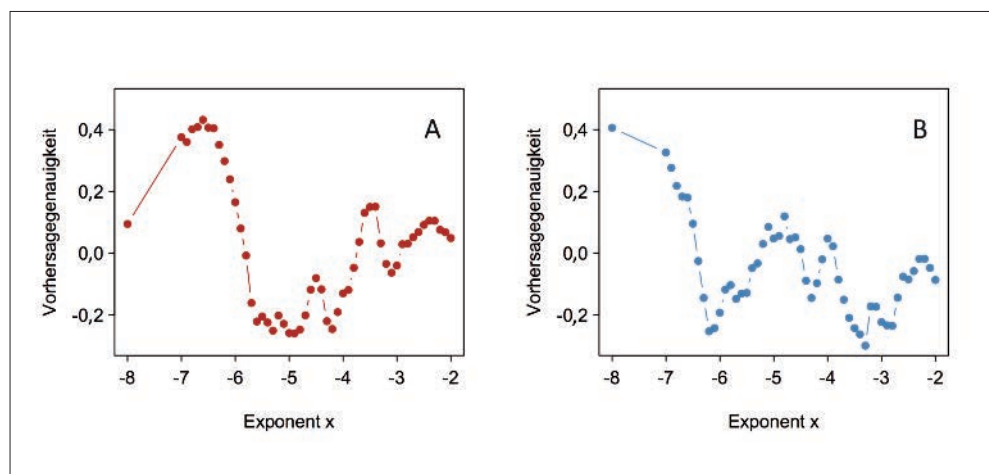


Abb. 1 Vorhersagegenauigkeit des additiven Modells mit Vorauswahl der SNPs mittels einer genomweiten Assoziationsstudie in Abhängigkeit vom Schwellenwert x für (A) weibliche und (B) männliche Individuen.

Sowohl für männliche als auch für weibliche Individuen ergibt sich bei optimaler Wahl des Schwellenwerts x eine empirische Genauigkeit der Vorhersage $> 0,4$. Der optimale Wert stellt sich bei den weiblichen Individuen bei einem Schwellenwert von $p = 10^{-6,6}$ ein, womit im Durchschnitt über alle 176 Wiederholungen 4–5 signifikante SNPs ausgewählt werden. Bei den männlichen Tieren hingegen liegt der optimale Schwellenwert bei $p = 10^{-8}$, und es wird nur ein einziger SNP für die Vorhersage verwendet. Sobald zu diesen aussagekräftigen SNPs weitere weniger aussagekräftige SNPs hinzugenommen werden, fällt die Vorhersagegenauigkeit ab und pendelt sich um den Wert ein, der mit dem gesamten SNP-Datensatz erreicht wird. Dieses Muster entspricht den theoretischen Erwartungen und bestätigt die Hypothese von DE LOS CAMPOS et al. (2013).

Da die Analysen der individuellen Phänotypen für das Merkmal CCR Hinweise auf epistatische Genwirkungen erbrachten, wurde als nächstes geprüft, ob verschiedene epistatische Modelle zu einer besseren Vorhersage führen. Hierzu kamen drei Modelle zum Einsatz:

- Modell 1: Es wurde eine additiv x additiv-Komponente in das GBLUP-Modell eingeführt, deren Kovarianzstruktur als Hadamard-Produkt der genomischen Verwandtschaftsmatrix G mit sich selbst berechnet wurde, also $G \# G$.
- Modell 2: Es wurde zunächst eine genomweite epistatische Assoziationsanalyse durchgeführt. Dann wurde mit den SNPs, die signifikant zu epistatischen Interaktionen beitragen, eine additiv genomische Verwandtschaftsmatrix G^* berechnet, anschließend wurde die reduzierte epistatische Verwandtschaftsmatrix $G^* \# G^*$ aufgestellt und im Vorhersagemodell verwendet.
- Modell 3: Wie in Modell 2 wurde zunächst eine genomweite epistatische Assoziationsanalyse durchgeführt. Danach wurde für jedes epistatisch interagierende SNP-Paar i, j für jeden der beiden SNPs eine genomische Verwandtschaftsmatrix G_i und G_j aufgestellt, danach wurde das Hadamard-Produkt $G_i \# G_j$ dieser beiden Matrizen berechnet und über alle signifikanten epistatischen SNP-Paare gemittelt. Dieser Ansatz ist eine Erweiterung der von ASTLE und BALDING (2009) vorgeschlagenen additiven genomischen Verwandtschaftsmatrix.

Für die in Modell 2 und 3 vorgeschaltete epistatische GWAS wurde der SNP-Datensatz zunächst auf die 672636 SNPs reduziert, die eine $MAF > 0,15$ hatten. Damit musste aber immer noch in jeder der 176 LookV-Wiederholungen eine epistatische GWAS mit $2,2 \times 10^{11}$ SNP-Paaren durchgeführt werden. Es wurden nur additiv x additive-Interaktionen geprüft, da es sich bei dem Material um vollständig homozygote Inzuchtlinien handelte und somit keine Dominanzeffekte und daher auch keine Interaktionskomponenten mit Dominanzanteil geschätzt werden konnten.

Die epistatischen Modelle unterscheiden sich in der Art und Anzahl der additiv x additiv-Interaktionen, die sie für die Schätzung berücksichtigen. Im Modell 1 werden die Interaktionen jedes SNPs mit jedem anderen SNP modelliert. Da keine Modellauswahl stattfindet, sind dies also $2,2 \times 10^{11}$ Interaktionen. In Modell 2 und 3 findet eine variable SNP-Vorauswahl statt. Werden hier N signifikante SNP-Paare ausgewählt, berücksichtigt Modell 2 die $2N(2N-1)/2$ -Interaktionen aller ausgewählten SNPs untereinander, mit z. B. $N = 3000$ Paaren, wären das immer noch ca. 18 Millionen Interaktionen. Zu beachten ist hier, dass in diesem Modell für einen SNP x die Interaktion mit allen anderen ausgewählten SNPs modelliert wird, auch wenn SNP x nur mit einem anderen SNP y signifikant interagiert. In Modell 3 werden hingegen nur genau die N paarweisen Interaktionen im Vorhersagemodell berücksichtigt, die unter dem vorgegebenen Schwellenwert signifikant sind.

In der LookV führten Modell 1 und Modell 2 zu keiner Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit gegenüber dem additiven Modell. Hingegen erbrachte Modell 3 in Abhängigkeit vom gewählten Schwellenwert eine deutliche Verbesserung der genomischen Vorhersage (Abb. 2) mit einer Korrelation von 0,35 in beiden Geschlechtern. Bei den weiblichen Tieren erwies sich ein Schwellenwert von $p = 10^{-13,6}$ als optimal, womit im Durchschnitt 30 SNP-Paare in die Schätzung einbezogen wurden, bei den männlichen Tieren war der optimale Schwellenwert $p = 10^{-10,8}$, und es wurden mit 3232 SNP-Paaren deutlich mehr Interaktionen ausgewählt.

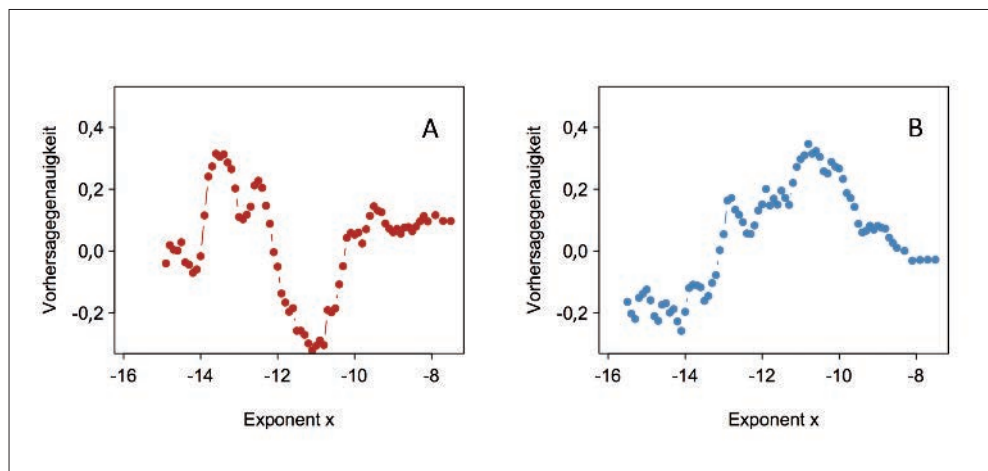


Abb. 2 Vorhersagegenauigkeit des epistatischen Modells 3 mit Vorauswahl der SNPs mittels einer genomweiten epistatischen Assoziationsstudie in Abhängigkeit vom Schwellenwert x für (A) weibliche und (B) männliche Individuen.

Schließlich wurde noch geprüft, ob eine weitere Verbesserung der Vorhersage mit einer Kombination des optimalen epistatischen Modells mit dem optimalen additiven Modell (mit Vorauswahl der SNPs auf Basis einer GWAS) zu erreichen ist. Wie aus Abbildung 3 deutlich wird, ist dies insbesondere bei den männlichen Tieren der Fall, während bei den weiblichen Tieren die maximale Genauigkeit nur unwesentlich erhöht wird.

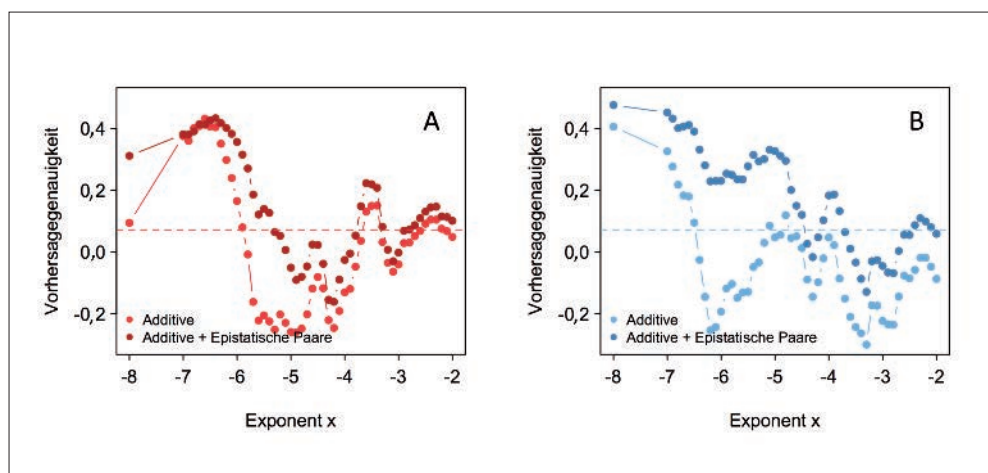


Abb. 3 Vorhersagegenauigkeit des additiven Modells mit Vorauswahl der SNPs mittels einer genomweiten Assoziationsstudie in Abhängigkeit vom Schwellenwert x für (A) weibliche und (B) männliche Individuen ohne (helle Kurven) und mit (dunkle Kurven) Kombination mit der optimalen Variante des epistatischen Modells 3.

4. Diskussion

Die Ergebnisse legen nahe, dass das Merkmal *Chill Coma Recovery* bei männlichen und weiblichen Tieren auf unterschiedliche Weise genetisch reguliert ist. Während bei den männlichen Tieren ein Hauptgen und sehr viele (ca. 3000) interagierende Loci der genetischen Variation zu Grunde liegen, wird das gleiche Merkmal bei weiblichen Tieren von 4–5 Hauptgenen und relativ wenigen (ca. 30) interagierenden Loci gesteuert. Weitergehende Analysen (OBER et al. 2014) haben ergeben, dass die informativen Marker in beiden Geschlechtern zwar grundsätzlich in den gleichen *Pathways* liegen, die Effizienz dieser metabolischen Prozesse jedoch anscheinend über unterschiedliche Teile der *Pathways* in den beiden Geschlechtern genetisch reguliert wird.

Für die Zucht landwirtschaftlicher Nutztiere wirft dieses Ergebnis die Frage auf, ob man grundsätzlich davon ausgehen sollte, dass das gleiche Merkmal bei männlichen und weiblichen Tieren der gleichen genetischen Regulierung unterliegt. Während viele relevante Merkmale bei Nutztieren (z. B. Milchleistung, Legeleistung, Reproduktionsmerkmale) geschlechtsbegrenzt sind, werden insbesondere Merkmale der Mastleistung häufig von männlichen und weiblichen Tieren erbracht. Es liegen nur wenige Untersuchungen zur genetischen Korrelation zwischen solchen Merkmalen vor (siehe z. B. EISEN und LEGATES 1966, DEL CASTILLO 2005), die in der Regel nahe bei 1 liegen. Jedoch war auch in der vorliegenden Studie die Korrelation zwischen den Mittelwerten der weiblichen und der männlichen Individuen der gleichen Inzuchtlinie für das Merkmal CRR $r = 0,87$. Trotzdem war es im vorliegenden Fall nicht möglich, mit einem mit den männlichen Phänotypen trainierten Modell die weiblichen Phänotypen vorherzusagen und umgekehrt. Aus diesen Beobachtungen lässt sich die Hypothese ableiten, dass in geeigneten Populationen (z. B. Mastschweine, Fleischrinder oder Mastgeflügel) die genomische Vorhersage für Mast- und Schlachtleistungsmerkmale von Tieren des einen Geschlechts (im Trainingsset) auf Tiere des anderen Geschlechts (im Validierungsset) eine deutlich geringere Genauigkeit hat, als wenn Modellentwicklung und -validierung im gleichen Geschlecht erfolgen. Dies sollte insbesondere dann zutreffen, wenn ein Verfahren der genomischen Zuchtwertschätzung mit Variablenselektion (z. B. BAYES B) verwendet wird. Diese Hypothese muss allerdings noch empirisch überprüft werden.

Literatur

- ASTLE, W., and BALDING, D. J.: Population structure and cryptic relatedness in genetic association studies. *Statist. Sci.* 24, 451–471 (2009)
- DEL CASTILLO, R. C.: The quantitative genetic basis of female and male body size and their implications on the evolution of body size dimorphism in the house cricket *Acheta domestica* (Gryllidae). *Genet. Mol. Biol.* [online] 28, 843–848 (2005)
- EISEN, E. J., and LEGATES, J. E.: A theoretical and experimental investigation of genotype-sex interaction and genetic correlation between sexes for body weight in *Mus musculus*. *Genetics* 54, 611–623 (1966)
- ERBE, M., YTOURNEL, F., PIMENTEL, E. C. G., SHARIFI, A. R., and SIMIANER, H.: Power and robustness of three whole genome association mapping approaches in selected populations. *J. Anim. Breed. Genet.* 128, 3–14 (2011)
- LOS CAMPOS, G. DE, VAZQUEZ, A. I., FERNANDO, R., KLIMENTIDIS, Y. C., and SORENSEN, D.: Prediction of complex human traits using the genomic best linear unbiased predictor. *PLOS Genet.* 9, e1003608 (2013)
- MACKAY, T. F. C., RICHARDS, S., STONE, E. A., BARBADILLA A., AYROLES, J. F., ZHU, D., CASILLAS, S., HAN, Y., MAGWIRE, M. M., CRIDLAND, J. M., RICHARDSON, M. F., ANHOLT, R. R., BARRÓN, M., BESS, C., BLANKENBURG, K. P., CARBONE, M. A., CASTELLANO, D., CHABOUB, L., DUNCAN, L., HARRIS, Z., JAVOID, M., JAYASEELAN, J. C., JHANGIANI, S. N., JORDAN, K. W., LARA, F., LAWRENCE, F., LEE, S. L., LIBRADO, P., LINHEIRO, R. S., LYMAN, R. F., MACKEY, A.

Hinweise auf eine geschlechtsdifferenzierte genetische Architektur für ein komplexes Fitnessmerkmal

- J., MUNIDAS, M., MUZNY, D. M., NAZARETH, L., NEWSHAM, I., PERALES, L., PU, L. L., QU, C., RÀMIA, M., REID, J. G., ROLLMANN, S. M., ROZAS, J., SAADA, N., TURLAPATI, L., WORLEY, K. C., WU, Y. Q., YAMAMOTO, A., ZHU, Y., BERGMAN, C. M., THORNTON, K. R., MITTELMAN, D., and GIBBS, R. A.: The *Drosophila melanogaster* genetics reference panel. *Nature* 482, 173–178 (2012)
- MEUWISSEN, T. H. E., HAYES, B. J., and GODDARD, M. E.: Prediction of total genetic value using genomewide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819–1829 (2001)
- OBER, U., AYROLES, J. F., STONE, E. A., RICHARDS, S., ZHU, D., GIBBS, R. A., STRICKER, C., GIANOLA, D., SCHLATHER, M., MACKAY, T. F., and SIMIANER, H.: Using whole-genome sequence data to predict quantitative trait phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 8, e1002685 (2012)
- OBER, U., HUANG, W., MAGWIRE, M., SCHLATHER, M., SIMIANER, H., and MACKAY, T. F. C.: Accounting for genetic architecture improves genomic prediction for a *Drosophila* fitness trait. *PLoS Genet.*, (2014, submitted)
- VAN RADEN, P. M.: Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 91, 4414–4423 (2008)

Prof. Dr. Henner SIMIANER
Abteilung Tierzucht und Haustiergenetik
Department für Nutztierwissenschaften
Georg-August-Universität Göttingen
Albrecht-Thaer-Weg 3
37075 Göttingen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 551 395604
Fax: +49 551 395587
E-Mail: hsimian@gwdg.de

Die Bedeutung von Bildung in einer Dienstleistungs- und Wissensgesellschaft.

Welchen Bildungsauftrag hat die Universität?

Symposium veranstaltet von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften, der Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg und der VolkswagenStiftung am 19. Mai 2015 im Tagungszentrum Schloss Herrenhausen, Hannover

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 121, Nr. 407

Herausgegeben von Marita HILLMER und Katharina AL-SHAMERY (Oldenburg)
(2015, 132 Seiten, 22 Abbildungen, 21,95 Euro, ISBN: 978-3-8047-3513-2)

Wie sieht die moderne Universität des 21. Jahrhunderts aus? Im Spannungsfeld des Bologna-Prozesses und der Exzellenzinitiative, die bereits starke Umbrüche in den deutschen Universitäten bewirkten und im Rahmen von vertikalen und funktionalen Differenzierungen die Voraussetzungen für die Entwicklung neuer Profile in Forschung und Lehre geschaffen haben, steht der Bildungsauftrag von Universitäten zur Diskussion.

Der tiefgreifende Veränderungsprozess von der Universität als Bildungsstätte einer kleinen Elite hin zur Öffnung der Hochschulen für fast jedes Gesellschaftsmitglied ist, bei gleichzeitiger explosionsartiger Zunahme der Komplexität einer global agierenden Gesellschaft, der Ausgangspunkt aktueller Entwicklungen im Hochschulsystem. Einem Diskurs zum Bildungsbegriff und der Neuinterpretation des klassischen Bildungsverständnisses folgen Überlegungen zu den Herausforderungen der Digitalisierung als einem möglichen zukünftigen Haupttreiber des Wandels im Bildungssystem sowie ein Gedankenaustausch über die Wissenschaftskultur und notwendige Freiräume für neue Lehr- und Lernformate.

Geschlechtsdetermination bei der Fischart *Tilapia (Oreochromis niloticus)*: Von familienbasierten QTL-Studien, über Kandida- tengene hin zu genomweiten Ansätzen

Stephan WESSELS,¹ Liane Magdalena LÜHMANN,¹ Ina KRAUSE,¹
Ahmad Reza SHARIFI,² Sawichaya RUEANGSRI,¹ Julia BECK,³
Ekkehard SCHÜTZ,³ Gabriele HÖRSTGEN-SCHWARK¹ und Christoph KNORR⁴

Zusammenfassung

Nilbuntbarsche (*Oreochromis niloticus*) sind weltweit die zweitwichtigste Aquakulturspezies. Bei der Produktion dieser Fischart werden rein-männliche Bestände aufgrund des maternalen Maulbrutverhaltens und resultierendem Geschlechtsdimorphismus zungunsten der Weibchen bevorzugt. Bisher erfolgt die Erstellung eingeschlechtlicher Bestände fast ausschließlich über die Gabe synthetischer, männlicher Hormone an die Fischbrut. Diese Methode könnte zukünftig von umweltfreundlicheren Temperaturprotokollen abgelöst werden, denn bei Nilbuntbarschen gibt es neben einer genetischen eine temperaturabhängige Geschlechtsausprägung, die erblich ist. Die Voraussetzung für deren Nutzung ist eine einfache zuverlässige Identifikation temperatursensibler Elterntiere, die bevorzugt die gewünschten Nachkommengeschlechterverhältnisse durch eine Temperaturbehandlung ermöglichen. Die Nutzung genetischer Marker in Aquakulturzuchtprogrammen verkürzt die Zeit zur Identifikation sensibler Tiere und macht eine Testung der Nachkommen weitgehend überflüssig, wodurch auch Kosten für die Aufzucht enorm reduziert werden könnten. Das Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war die Identifikation genetischer Marker oder Chromosomensegmente, die mit der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung bei Nilbuntbarschen assoziiert sind. Stetige Kostenreduktionen bei gleichzeitiger Effizienzsteigerung ermöglichen heutzutage den Einsatz von Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien bei vielen Tierarten auch ohne vorhandenes Referenzgenom. Die vorliegende Studie beschreibt unter anderem eine Variante des *Genotyping-by-Sequencing*, die zur Identifikation genomweiter Polymorphismen eingesetzt wurde und stellt erste Ergebnisse dieses Ansatzes vor.

Abstract

Tilapia nowadays represents a mainstay of global aquaculture production, being the second most produced species world-wide. Despite its sturdy character, sex control is one of the major issues during production. High fecundity and maternal mouth brooding behaviour often result in dramatically stunted growth of cultured *tilapia*. Therefore sustainable sex-control protocols, substituting the prevalent administration of synthetic hormones, to produce all-male *tilapia* are required. Temperature-dependent sex reversal might be one mechanism to enable such eco-friendly approaches. Temperature effects on the phenotypic sex of *tilapia* have been shown to be heritable. However, any large scale application of this technique is hampered due to the time-consuming identification of temperature-responsive breeders, as it necessitates progeny testing at elevated temperatures. The identification of genetic markers that are associated with the temperature-dependent phenotypic sex would greatly facilitate the introduction of this approach into current breeding

-
- 1 Department für Nutztierwissenschaften – Abteilung für Aquakultur und Gewässerökologie, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.
 - 2 Department für Nutztierwissenschaften – Abteilung für Tierzucht und Haustiergenetik, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.
 - 3 Chronix Biomedical GmbH, Göttingen.
 - 4 Department für Nutztierwissenschaften – Abteilung Biotechnologie und Reproduktion landwirtschaftlicher Nutztiere, Georg-August-Universität, Göttingen.

programs. The advent of low prices and highly efficient genotyping platforms gives access to genome-wide data for a large array of species, even without the existence of a reference genome. Here we describe how genotyping-by-sequencing facilitates to discover large numbers of genome-wide polymorphisms. First results are presented.

1. Geschlechtsdeterminierende Mechanismen höherer Wirbeltiere

Das Verständnis der geschlechtsdeterminierenden Mechanismen bleibt besonders bei Fischen weiterhin eine große Herausforderung für die Wissenschaft. Verschiedene geschlechtsdeterminierende Mechanismen sind verantwortlich für die Ausprägung des Verhältnisses von Männchen zu Weibchen (Populationsgeschlechterverhältnisses), das entscheidend für die Überlebensfähigkeit und Stabilität einer Population ist. Bisher wurden bei den Wirbeltieren genetische (GSD) oder umweltabhängige (ESD) bzw. temperaturabhängige (TSD) Mechanismen der Geschlechtsdetermination beschrieben (SARRE et al. 2011, 2004, QUINN et al. 2011).

Säuger bzw. Vögel weisen mit einer männlichen (XY/XX) bzw. weiblichen Heterogametrie (WZ/ZZ) stabile chromosomale Systeme der Geschlechtsdetermination auf. Bei den Säugern wird das Geschlecht, bis auf wenige Ausnahmen, bei der Befruchtung durch die Präsenz oder Abwesenheit des Y-chromosomalen Gens *Sry* (*Sex Determining Region on the Y Chromosome*) unwiderruflich bestimmt (SINCLAIR et al. 1990). Die Phase der Geschlechtsdetermination findet bei Säugern und Vögeln bei sehr kontrollierten Umgebungstemperaturen statt. Bei Vögeln scheint die Geschlechtsdetermination in Abhängigkeit der Dosis des Gens *Dmrt1* (*Double-sex- and mab3-related transcription factor 1*), das auf den Z-Chromosomen liegt, zu erfolgen (SMITH et al. 2009).

Im Gegensatz dazu gibt es bei wechselwarmen Tieren, d. h. den Amphibien, den Reptilien und vor allem den Fischen, eine beeindruckende Bandbreite der geschlechtsdeterminierenden Systeme. Männliche (XY, XXY) oder weibliche (WZ, WZZ oder WWZ) Heterogametrie wurden bei Schildkröten oder Schlangen beschrieben, wohingegen die Existenz beider Systeme bei Eidechsen und Fischen beobachtet wurde (SARRE et al. 2004). Bei Fischen können zudem komplexere Systeme mit multiplen Geschlechtschromosomen (X, W und Z) innerhalb einer Spezies (z. B. *Xiphorou maculatus*) existieren (SCHARTL 2004). Mehr als 1700 Fischarten wurden bisher zytogenetisch charakterisiert. Davon weisen 176, d. h. 10,4 %, zytogenetisch unterscheidbare Geschlechtschromosomen auf (DEVLIN und NAGAHAMA 2002). In die Geschlechtsdetermination involvierte Gene können dabei über das gesamte Genom verteilt, auf einzelne Chromosomen oder auf einen einzigen Locus beschränkt sein (DEVLIN und NAGAHAMA 2002). Nur bei wenigen Fischarten konnte ein allein geschlechtsbestimmendes Gen gefunden werden, wie z. B. *Dmy* (*Y-specific DM-domain gene*) beim Medakafisch (*Oryzias latipes*) (MATSUDA et al. 2002, NANDA et al. 2002), *AmhY* (*Y chromosome specific anti-Müllerian hormone*) beim patagonischen Ährenfisch (*Odonthestis hatcheri*) (HATTORI et al. 2010), *Gsdf* (*gonadal soma derived growth factor on the Y chromosome*) beim Reisfisch (*Oryzias luzonensis*) (KAMIYA et al. 2012), *Amhr2* (*anti-Müllerian hormone receptor type II*) beim Kugelfisch (MYOSHO et al. 2012) und *sdY* (*sexually dimorphic on the Y chromosome*) bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) (YANO et al. 2012).

Bei vielen Fischarten wurde zudem eine temperaturabhängige Geschlechtsausprägung beschrieben. Nachdem beim neuweltlichen Ährenfisch 1981 bei Feld- und Laborversuchen eine temperaturabhängige Geschlechtsausprägung festgestellt wurde, konnte diese Form der Geschlechtsdetermination seither bei mehr als 60 Fischarten nachgewiesen werden (BAROILLER

et al. 2009). Oftmals gibt es wenige Hinweise auf genetische Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren mit temperaturabhängiger Geschlechtsausprägung. Erste Unterschiede zwischen Geschlechtern treten oft aufgrund von Fluktuationen in der Umwelttemperatur auf, die zu unterschiedlichen Ausprägungen des phänotypischen Geschlechts und des Geschlechterverhältnisses führen können. Eine thermolabile Phase geht oft mit der Geschlechtsdifferenzierung einher. Die Geschlechtsdetermination findet bei den (höheren) Wirbeltieren allerdings oft bereits mit der Befruchtung der Eizelle statt. Dieses genetische Programm kann jedoch durch die umweltabhängigen Faktoren beeinflusst oder sogar außer Kraft gesetzt werden.

2. Temperaturabhängige Geschlechtsdetermination bei *Oreochromis niloticus*

Die Tilapien der Gattung *Oreochromis* stellen eine hervorragende Modellfischart zur Untersuchung der Evolution der geschlechtsdeterminierenden Mechanismen bei Fischen und anderen Vertebraten dar. Die Ausprägung des phänotypischen Geschlechts wird primär über Geschlechtschromosomen mit weiblicher (WZ/ZZ wie bei *O. aureus*) oder männlicher (XY/XX wie bei *O. niloticus*) Heterogamete bestimmt. Deren Wirkung kann jedoch durch autosomale Faktoren in bestimmten allelen Konfigurationen überlagert werden (MUELLER-BELECKE 1995, BAROILLER et al. 2009, WESSELS et al. 2014).

Als Umweltfaktor hat ferner die Wassertemperatur einen starken Einfluss auf die phänotypische Geschlechtsausprägung. Ab einer Wassertemperatur von 32 °C kann eine funktionelle Vermännlichung genetisch weiblicher (XX) Nachkommenschaften erfolgen (BAROILLER et al. 1995). Temperaturbehandlungen waren effektiv, wenn sie beginnend am 10. Tag nach der Befruchtung (dpf) für 10 Tage oder länger appliziert wurden (BAROILLER et al. 1995, TESSEMA et al. 2006, WESSELS und HÖRSTGEN-SCHWARK 2007, 2011). Eine gleich lange Behandlung (10 Tage) beginnend mit dem 7. Tag nach Befruchtung hatte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die Geschlechterverteilung (BAROILLER et al. 1995). In dem zuvor genannten Zeitfenster (10–20 dpf) können auch andere externe Faktoren, wie z. B. Hormone und Aromataseinhibitoren, zu einer funktionellen Geschlechtsumkehr führen (NAKAMURA et al. 1998, BAROILLER et al. 1999, GUIGUEN et al. 2010).

TESSEMA et al. (2006) zeigten, dass temperaturabhängige Geschlechterverhältnisse in Familien von *O. niloticus* stark zwischen und innerhalb von Populationen variierten. Weiterhin zeigten deren Untersuchungen eine hohe Reproduzierbarkeit der temperaturabhängigen Geschlechterverhältnisse und wiesen auf die Erbllichkeit dieses Merkmals hin. Diese Annahme konnte anhand eines Selektionsexperiments von WESSELS und HÖRSTGEN-SCHWARK (2007) überprüft und bestätigt werden, da diese nach zwei Generationen durch Selektion auf den Männchenanteil in Temperaturbehandlungsgruppen (36 °C für 10 Tage) einen prozentualen Anteil von 89,7 %, im Vergleich zur Ausgangssituation von 65,6 %, erzielten (Tab. 1). Gleichmaßen konnte durch Selektion eine Verringerung des Männchenanteils auf 53,9 % (Niedrig-Linie) erreicht werden. Eine realisierte Heritabilität von 0,78 (als das Mittel der beiden Linien) spiegelt einen hohen Selektionserfolg wider, der in Populationsstandardabweichungen ausgedrückt 0,8 bzw. 0,5 betrug. In der dritten Selektionsgeneration konnte der Männchenanteil auf 93 % erhöht (Hoch-Linie) werden. In der Niedrig-Linie veränderte sich das Geschlechterverhältnis ebenfalls weiter und wies eine 1:1 Verteilung auf (WESSELS und HÖRSTGEN-SCHWARK 2011). Dieses Selektionsexperiment zeigte erstmalig, dass bei gemischtge-

schlechtlichen Populationen (XX/XY) von *O. niloticus*, ausgehend von einer vermännlichen Wirkung (65,6 % Männchen) der Temperaturbehandlung (36 °C für 10 Tage), die Sensitivität so verändert werden konnte, dass in der Hoch-Linie die Produktion fast rein-männlicher Nachkommenschaften (93 %; n = 6 Familien > 95 % Männchen; n = 2 Familien mit 100 % Männchen und n = 103 und n = 104 gesexten Fische) möglich ist. In der Niedrig-Linie führte die Temperaturbehandlung in der dritten Selektionsgeneration in 9 von 20 Familien (n = 2 signifikant verschieden von 50:50) zur Verweiblichung der Tiere.

Tab. 1 Männchenanteile in den Behandlungsgruppen (36 °C/10 Tage) und Kontrollen (28 °C) nach drei Selektionsgenerationen (SG)

Generation	Linie	ÜR %	n gesexzte Fische	♂ % 36 °C/10 Tage	ÜR %	n gesexzte Fische	♂ % 28 °C
Basispopulation		76,6 n. s.	2720	65,6 ^c ± 17,1	75,5	2749	51,6 ± 7,4
SG 1 (n = 66)	hoch	77,1 n. s.	5788	71,7 ^c ± 14,8	76,3	5649	49,9 ± 5,1
	(n = 72) niedrig	75,7 n. s.	6568	65,3 ^c ± 12,8	76,2	6423	49,8 ± 4,5
SG 2 (n = 26)	hoch	75,2 n. s.	1803	89,7 ^c ± 8,9	74,0	1702	50,4 ± 5,7
	(n = 13) niedrig	74,5 n. s.	1065	53,9 ^b ± 9,2	72,9	1029	48,8 ± 8,1
SG 3 (n = 13)	hoch	85,1 n. s.	1086	93,0 ^c ± 6,7	76,4	942	53,5* ± 8,7
	(n = 20) niedrig	81,7 n. s.	1554	49,3 ± 9,8	77,5	1430	51,5 ± 5,1

(Daten aus WESSELS und HÖRSTGEN-SCHWARK 2007, 2011; n = Anzahl Familien; ÜR = Überlebensrate in %; ♂ = Männchenanteil in %; c² = Abweichung von der entsprechenden Kontrolle; b = signifikant ≤ 0,001; c = signifikant ≤ 0,0001; * = signifikant verschieden von 1:1 ≤ 0,05)

Neben den über das Selektionsexperiment erhaltenen klassischen Genotypen (XX-Weibchen und XY-Männchen) konnten funktionelle Milchner (XX) aus fünf temperaturbehandelten (36 °C/10 Tage) Familien der Hoch-Linie über Nachkommestestung identifiziert werden. Nachkommengruppen dieser hochsensiblen funktionellen Milchner aus Anpaarungen mit XX-Rognern wiesen bei einer Haltungstemperatur von 28 °C Männchenanteile von 0 % auf (LÜHMANN et al. 2009).

3. Genetische Geschlechtsbestimmung (GSD) bei *O. niloticus* und genetische Marker

Die erste genetische Karte von Tilapien enthielt 525 Mikrosatelliten und 21 genbasierte Marker und erstreckte sich über 1311 centi-Morgan (cM), die zu 24 Kopplungsgruppen zugeordnet wurden. Als Kartierungspopulation diente eine F₂-Familie, die aus den Spezies *O. niloticus* und *O. aureus* hervor ging (LEE et al. 2005). Einige der in den Kopplungsgruppen 1, 3 und 23 lokalisierten Mikrosatellitenmarker weisen bei Tilapien in Rein- bzw. in Kreuzungszucht (*O. niloticus*, *O. aureus*, *O. niloticus* × *O. aureus* und *O. aureus* × *O. mossambicus*) eine Assoziation mit dem phänotypischen Geschlecht auf, wenn alle Tiere bei einer Temperatur von etwa 28 °C aufgezogen wurden (SHIRAK et al. 2002, LEE et al. 2003, CNAANI et al. 2004, 2008, KARAYÜCEL et al. 2004, LEE und KOCHER 2005, CNAANI und KOCHER 2008). Der geschlechtsbestimmende Hauptfaktor (XX/XY) der genetischen Geschlechtsdeterminierung von *O. niloticus*

lag bei dieser ersten genetischen Karte bei 34,9 cM der Kopplungsgruppe 1 zwischen den Mikrosatelliten UNH995 und GM201 (CNAANI et al. 2008). Bei Kreuzungszuchten von *O. aureus* und *O. mossambicus* konnte auch auf der Kopplungsgruppe (LG) 23 in der Nähe der Mikrosatelliten UNH848 und UNH879 ein QTL (*Quantitative Trait Locus*) für die chromosomale Geschlechtsdetermination identifiziert werden (CNAANI et al. 2004). Die Gene *Amh* (*anti-Müllerian hormone*) und *Dmrta2* (*Doublesex- And Mab-3-Related Transcription Factor family A2*) wurden in einem Abstand von nur 5 bzw. 4 cM zu diesen Mikrosatelliten kartiert (SHIRAK et al. 2006). Sowohl *Amh* als auch *Dmrta2* gelten daher als Kandidatengene der Geschlechtsdetermination bei Tilapien (SHIRAK et al. 2006). CNAANI et al. (2008) schließen zusammenfassend auf eine starke genetische Geschlechtsdetermination bei *O. niloticus*, neben der aber eindeutig andere genetische und/oder Umweltfaktoren aktiv sind.

In aktuellen Arbeiten konnte der genetische Hauptfaktor weiter eingegrenzt und ein autosomaler QTL auf LG 20 identifiziert werden (PALAIOKOSTAS et al. 2013, 2015). Die Autoren typisierten große Anzahlen von SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) mittels *restriction site associated sequencing* (*Rad-seq*) (BAIRD et al. 2008). Auf der neu berechneten genetischen Karte konnte der Hauptgeschlechtsfaktor in LG 1 in einem 3 cM großen Bereich lokalisiert werden. Dieser Bereich enthält 10 annotierte Gene, neben 14 Chromosomenbereichen, die durch die Genomsequenzierung bisher nicht abgedeckt wurden. Die Autoren entwickelten darüber hinaus Hochdurchsatz-Assays um drei in diesem Intervall liegende SNP zu typisieren und konnten auf diese Weise den QTL populationsweit bestätigen (PALAIOKOSTAS et al. 2013).

4. Die temperaturabhängige Geschlechtsausprägung und genetische Marker

Auch die temperaturabhängige Geschlechtsausprägung wurde mittels QTL-Scan untersucht. LÜHMANN et al. (2012) führten Untersuchungen mit Familien durch, welche unter normalen Aufzuchttemperaturen (28 °C) lediglich weibliche Tiere aufwiesen (genetisch rein-weiblich mit XX-Hauptgeschlechtsfaktor). Diese von einer stark temperatursensiblen Linie (WESSELS und HÖRSTGEN-SCHWARK 2007, 2011) abstammende Testpopulation entstand durch Anpaarung temperaturbehandelter, funktioneller Milchner (XX) mit XX-Rognern. Nachkommen aus sechs Vollgeschwistergruppen wurden bei 28 °C und 36 °C vom 10. bis zum 20. Lebensstag aufgezogen, und nach ca. 136 Tagen wurde das (phänotypische) Geschlecht bestimmt. Anschließend wurden 180 Tiere der temperaturbehandelten Gruppen mittels 21 Mikrosatelliten auf den LG 1, 3 und 23 typisiert. Dabei wurden familienspezifische QTL auf LG 1, flankiert durch die Mikrosatelliten UNH995 und UNH104, auf LG 3 in der Nähe des Mikrosatelliten GM213, und auf LG 23 nahe dem Mikrosatelliten GM283 detektiert. Aufgrund der Lokalisation des *amh*-Gens auf LG 23 in der Nähe des von LÜHMANN et al. (2012) kartierten QTL wurde dieses Kandidatengen näher untersucht. WESSELS et al. (2014) nahmen dabei zunächst eine vergleichende Sequenzierung des *amh*-Gens vor, um alle Varianten festzustellen. Im Anschluss daran wurde eine Stichprobe von temperaturbehandelten Tieren für vier segregierende SNP typisiert, und es wurden Assoziationen mit dem phänotypischen temperaturabhängigen Geschlecht untersucht. Der SNP mit dem größten Effekt auf die Ausprägung des phänotypischen Geschlechts wurde im Anschluss an einer repräsentativen Stichprobe von 305 temperaturbehandelten (36 °C, vom 10. bis 20. Lebensstag) und 125 Kontrolltieren (28 °C) getestet. In der Behandlungsgruppe mit im Mittel 40% Männchen konnten bei Präsenz des Genotyps CC des SNP ss831884014 die höchsten Männchenanteile verzeichnet werden (siehe Abb. 1).

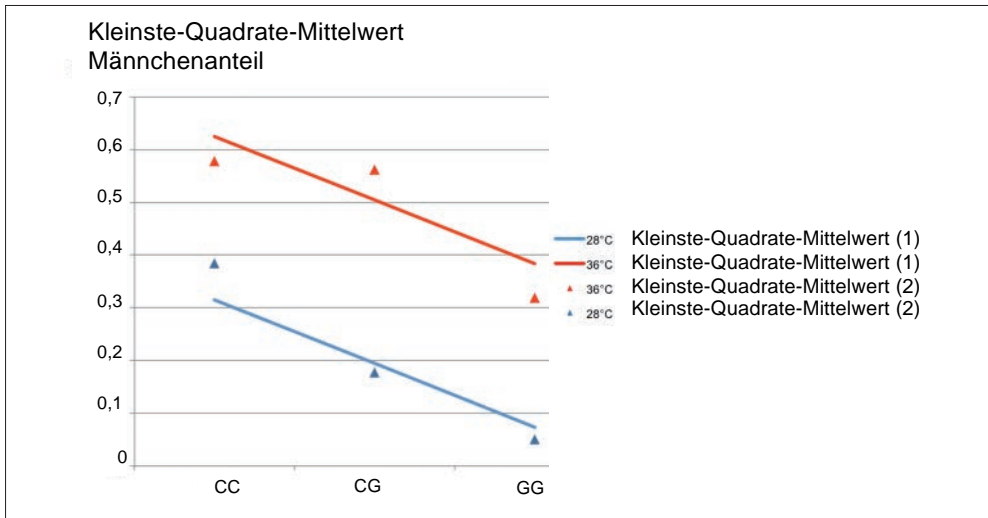


Abb. 1 Beziehung zwischen Männchenanteil und Genotyp von SNP ss831884014 im amh-Gen bei Tilapien in Abhängigkeit der Aufzuchttemperatur vom 10.–20. Lebenstag (WESSELS et al. 2014)

Ebenso konnte auch in der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Ausprägung des männlichen Phänotyps bei Vorhandensein des CC-Genotyps festgestellt werden. Im Mittel war jedoch in den Behandlungsgruppen der Effekt auf die Ausprägung des männlichen Geschlechts um 31 % erhöht, verglichen mit den Kontrollen. Weitere Untersuchungen sind nun nötig, um eine funktionelle Untersuchung des SNP ss831884014 im amh-Gen durchzuführen und die Rolle in der geschlechtsbestimmenden Kaskade zu identifizieren.

5. Kandidatengene der genetischen und temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung

Trotz einer stark genetischen Geschlechtsausprägung bei normalen Aufzuchttemperaturen (28 °C) ist die Temperatur in der Lage, die Wirkung dieser Faktoren zu überlagern, solange die Gonaden nicht ausdifferenziert sind. Als funktionelle Kandidatengene der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung werden *a priori* Gene der Geschlechtsdetermination und -differenzierung des Menschen herangezogen. Diese Gene werden ab einem bestimmten Stadium in testes- und ovarideterminierende Gene unterteilt. Allgemein wird trotz strukturell unterschiedlicher Gonaden bei Vertebraten eine funktionelle Konservierung der geschlechtsdeterminierenden und -differenzierenden Prozesse angenommen. Deshalb werden stromabwärts des geschlechtsbestimmenden Gens entwicklungs geschichtlich äquivalente Prozesse der geschlechtsdeterminierenden und -differenzierenden Kaskade vermutet.

Eine Reihe von orthologen, geschlechtsdifferenzierenden Genen der Säuger wurden bei Tilapien mittels *Real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht (KLUEVER et al. 2007, D’COTTA et al. 2008, IJIRI et al. 2008, POONLAPHDECHA et al. 2011, 2013). Obwohl diese Gene konserviert sind, traten viele räumliche und zeitliche Unterschiede der Expressionsmuster auf, die unter Umständen auf eine andere Funktion und Regulation hindeuten (BAROILLER et al. 2009). Abbildung 2 fasst die Kinetik einiger funktioneller Kandidatengene bei genetischen

Männchen (XY), temperaturbehandelten funktionellen Männchen (Δ XX) und bei normalen Weibchen (XX) zusammen. Die thermolabile oder kritische Phase der phänotypischen Geschlechtsausbildung befindet sich im Zeitraum von Tag 10 bis 20 dpf. Bei genetischen Männchen erhöhte sich im Zeitraum von Tag 9–15 besonders die Expression testisspezifischer Gene (*Dmrt1*, *Amh*), während die Expression ovarispezifischer Gene (*Esr* [estrogen receptor], *Dax1* [dose-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1], *FoxL2* [Fork head box protein L2]) abnahm. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Expression ovarendifferenzierender Gene wie *FoxL2*, *Dax1* und *Cyp19a* (Cytochrome-P450-Aromatase) bei genetischen Weibchen, während auch hier die Expression von *Esr* und *Sf1* (*splicing factor 1*) sank. Bei funktionellen XX-Milchnern, die über eine Temperaturbehandlung vermännlicht wurden, kam es erst 15–19 Tage dpf zu einer verstärkten Expression von *Amh* und *Sox9s* (*Sex Determining Region Y-Box 9*). *FoxL2* und *Cyp19a*, die ovarispezifisch sind, werden in ihrer Expression beginnend mit dem 17. Tag bis hin zum 26. Tag nach der Befruchtung stark unterdrückt (D’COTTA et al. 2008, IJIRI et al. 2008, POONLAPHDECHA et al. 2011, 2013).

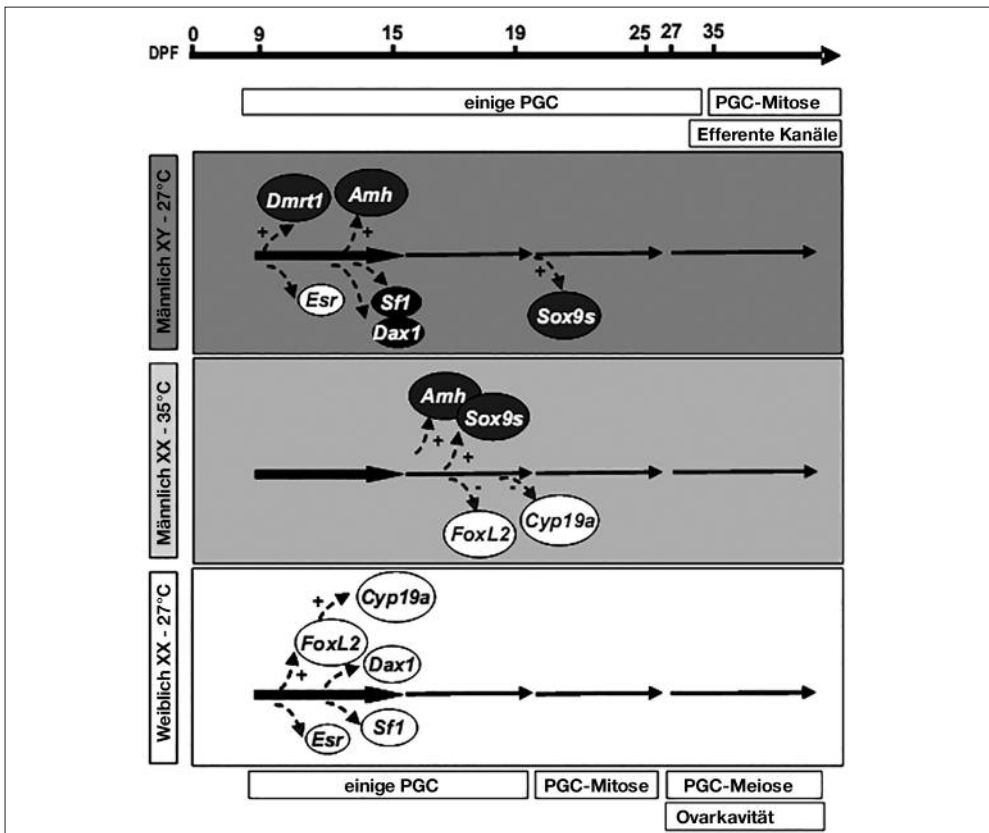


Abb. 2 Schematische Darstellung von Genexpressionsmustern in Tilapiengonaden von normalen Weibchen (XX, Abb. unten), genetischen Männchen (XY, Abb. oben) und temperaturbehandelten funktionellen Männchen (Abb. Mitte). Der große Pfeil repräsentiert die kritische Phase der Geschlechtsdifferenzierung. Weiße Kreise stehen für weiblichende Gene, schwarze Kreise für vermännlichende Gene. Ein Plus-Zeichen bedeutet eine verstärkte Expression, ein Minus-Zeichen eine ausgehend vom Betrachtungszeitpunkt verminderte Expression (BAROILLER et al. 2009). PGC = Primordiale Keimzellen.

In aktuellen Arbeiten wurde das Transkriptom der Gonaden von Beginn der Geschlechtsdifferenzierung bis hin zum adulten Tier bei genetisch weiblichen (XX) und männlichen (XY) Tilapien untersucht (TAO et al. 2013). Insgesamt zeigte sich, dass in den Gonaden vom 5. bis zum 180. Lebenstag insgesamt 21 334 Gene exprimiert wurden. Davon waren 259 Gene nur bei genetisch männlichen Tieren und 69 nur bei genetisch weiblichen Tieren nachzuweisen. Steroidogene Enzyme wurden während der frühen Stadien (5 Tage nach Schlupf) lediglich bei genetischen Weibchen produziert. Nach 90 Tagen verkehrte sich das Expressionsmuster ins Gegenteil. Steroidogene Enzyme waren jetzt bei genetischen Männchen stark hoch reguliert. Daraus folgerten die Autoren, dass zu Beginn der Geschlechtsdetermination, entsprechend der kritischen Phase, Östrogene bei genetisch weiblichen Tieren produziert werden, jedoch keine Androgene bei genetisch männlichen Tieren. Die stärkste Expression der Gene der steroidogenen Achse wurde von Tag 30 bis 90 nach dem Schlupf beobachtet. Diese Phase geht einher mit der ersten Keimzellmeiose bei Weibchen und Männchen (KOBAYASHI und NAGAHAMA 2009). Besonders die permanent hohe Expression der gonadalen Form des Enzyms Aromatase (*Cyp19a1a*) deutet nach den Autoren auf dessen entscheidende Rolle für die Expression des geschlechtlichen Phänotyps und dessen Aufrechterhaltung hin. Kürzlich bestätigten LI et al. (2014) die entscheidende Rolle von *Cyp19a1a* bei der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung. Bei beiden Geschlechtern wurde eine stark verminderte Expression des Gens während der Haltung bei erhöhten Aufzuchttemperaturen beobachtet. Gleichzeitig wurde – bedingt durch die Temperaturbehandlung – eine verringerte Expression von Genen der Gonadotropin-Achse (*GTH* und *LH*) sowie des Östrogenrezeptors (*Er*) festgestellt. Des Weiteren könnten Hitzeschockproteine und epigenetische Faktoren eine Rolle während der temperaturabhängigen Geschlechtsentwicklung spielen (LI et al. 2014).

6. Aktuelle Ansätze zur Untersuchung der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung mittels Einsatz von *Genotyping-by-Sequencing*-Technologien

Welche genetischen Faktoren eine temperaturabhängige Geschlechtsumwandlung bedingen können, soll in aktuellen Untersuchungen mittels im Hochdurchsatz (*genotyping by sequencing*) erzeugten SNP-Markern anhand von Kopplungsanalysen und populationsweiten Ansätzen geklärt werden. Als QTL-Kartierungspopulation wurde dazu eine F₂-Population aus einer Linienkreuzung zwischen einer stark und schwach temperatursensiblen Zuchtlinie genutzt (LÜHMANN et al. 2009). Neben den über das Selektionsexperiment von WESSELS und HÖRSTGEN-SCHWARK (2007, 2011) erhaltenen klassischen Genotypen (XX-Weibchen, XY-Männchen) wurden funktionelle Milchner (XX) aus fünf temperaturbehandelten (36 °C/10 Tage) Familien der Hoch-Linie (> 93 % Männchen) über Nachkommentestung identifiziert. Alle Nachkommengruppen dieser stark temperatursensiblen, funktionellen Milchner aus Anpaarungen mit XX-Rognern der Niedrig-Linie wiesen bei einer Haltungstemperatur von 28 °C Männchenanteile von 0 % auf (LÜHMANN et al. 2009). Daher dienten diese Tiere als Grundlage zur Erstellung einer genetisch rein-weiblichen Linie, die aufgrund hoher Temperatursensibilität hohe Männchenanteile in Behandlungsgruppen hervorbringt. Auf diese Weise konnte das Auftreten männlicher Tiere in den Behandlungsgruppen ausschließlich auf Temperatureffekte zurückgeführt werden (mit Ausnahme von Tieren, die aufgrund von zufällig auftretenden Kombinationen rezessiver autosomaler oder auch bisher nicht charakterisierten epigenetischen Faktoren vermännlicht wurden).

Für alle weiter beschriebenen molekulargenetischen Arbeiten wurde eine F2-Familie mit 144 Individuen inklusive der Elterntiere genutzt. Der Männchenanteil in dieser Kohorte betrug 68 %. Hervorzuheben dabei ist, dass sowohl beide Eltern als auch alle Nachkommen eine Temperaturbehandlung bei 36 °C von Tag 10 bis Tag 20 nach der Befruchtung erfuhren.

Zur molekulargenetischen Analyse wurde ein Ansatz des sogenannten *Genotyping-by-Sequencing* gewählt (*double digest restriction site associated DNA sequencing ddRAD-seq*; PETERSON et al. 2012). Ziel dieses Ansatzes war es, gleichzeitig möglichst kosteneffizient eine Vielzahl von Tieren an identischen Loci des Tilapiagenoms zu genotypisieren. Da das relativ große Genom von Tilapien (927 GB) eine komplette Sequenzierung so vieler Tiere nicht erlaubte, wurde mittels der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *AluI* und anschließender, gezielter Größenselektion (~ 200–500 bp) der entstandenen Fragmente eine starke Reduktion des zu sequenzierenden Anteils des Genoms vorgenommen.

Zunächst wurde hochmolekulare DNA aus Flossenschnitten mittels des *DNeasy Blood and Mini Kits* (Qiagen, Redwood City, CA, USA) gewonnen. Die Integrität der DNA wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurden 500 bis 1000 ng der DNA durch die Restriktionsenzyme *EcoRI* (20000 U/ml) und *AluI* (10000 U/ml) (New England Biolabs, UK; NEB) in einem Ansatz von 30 µl für 3 h bei 37 °C zum Verdau inkubiert. Zur individuellen Kennzeichnung der DNA eines jeden Individuums wurde die DNA nun mit Adaptoren jeweils am 5' (*EcoRI*) und 3' (*AluI*) des entsprechend verdauten Fragments versehen. Jeder Adapter enthielt eine bekannte fünf Basenpaare lange Sequenz von Nukleotiden (Barcodes), die eine tierindividuelle *In-silico*-Analyse von im Pool (Multiplex) sequenzierten Proben erlaubte. Insgesamt wurden 24 verschiedene Barcodes eingesetzt. Da jedoch 144 Tiere sequenziert wurden, wurde unter Zuhilfenahme zusätzlicher Barcodes, die später mittels PCR in die zu sequenzierenden Fragmente eingefügt wurden, ein weiteres Multiplexing möglich. Die so erstellten Bibliotheken wurden im Anschluss mittels des Illumina HiSeq 2000- bzw. NextSeq500-Systems sequenziert. Auf diese Weise wurden 398 Millionen hoch qualitativer *Reads* von 100 bp Länge erzeugt. Im Anschluss wurde ein De-Multiplexing der tierindividuellen *Reads* durchgeführt, und alle *Reads* wurden auf eine Länge von 95 Basenpaaren getrimmt. Als Referenzgenom diente die Version *Orenil 1.070* des Tilapiagenoms, welche aus der Datenbank *Ensembl* (www.ensembl.org) herunter geladen wurde. Alle 398 Millionen *Reads* wurden anhand des Programms *Bowtie* (LANGMEAD 2010) auf dem Referenzgenom kartiert. Die so erhaltenen BAM-Dateien (*binary representation of the sequence alignment format*) wurden genutzt, um mittels des Programmpaketes *Genome Analysis Tool Kit GATK* (MCKENNA et al. 2010) Polymorphismen im Vergleich zum Referenzgenom zu identifizieren. Insgesamt wurden auf diese Weise 78 252 Polymorphismen mit einer von der Software errechneten Qualität von > 499 (entspricht einer hohen Qualität) in der hier getesteten Tilapienpopulation festgestellt. Dies entspricht einer Verteilung von einem Polymorphismus pro 11 697 Basenpaare. Weiterhin teilten sich die Polymorphismen in 73 777 SNP, 2311 Insertionen und 2164 Deletionen auf. Von besonderem Interesse sind dabei potentiell merkmalsbeeinflussende Polymorphismen, die sich oft in Form von sinnverändernden Mutationen (*Missense*-Mutationen) innerhalb eines Gens (im exonischen Bereich) äußern. Des Weiteren können auch andere Arten von Polymorphismen, wie z. B. unterschiedliche Spleißformen von Genen, Insertionen, Deletionen oder auch Punktmutationen im Promotorbereich eines Gens usw., ursächlich für eine erhöhte phänotypische Plastizität sein. Die verschiedenen Polymorphismen wurden mittels des Softwarepaketes *SNPeff* auf ihre Effektklasse untersucht (CINGOLANI et al. 2012). In den hier vorgestellten Untersuchungen lag fast die Hälfte aller Mutationen im intergenischen Bereich (47,2 %) (potentiell nicht merkmalsbeeinflussend; Abb. 3).

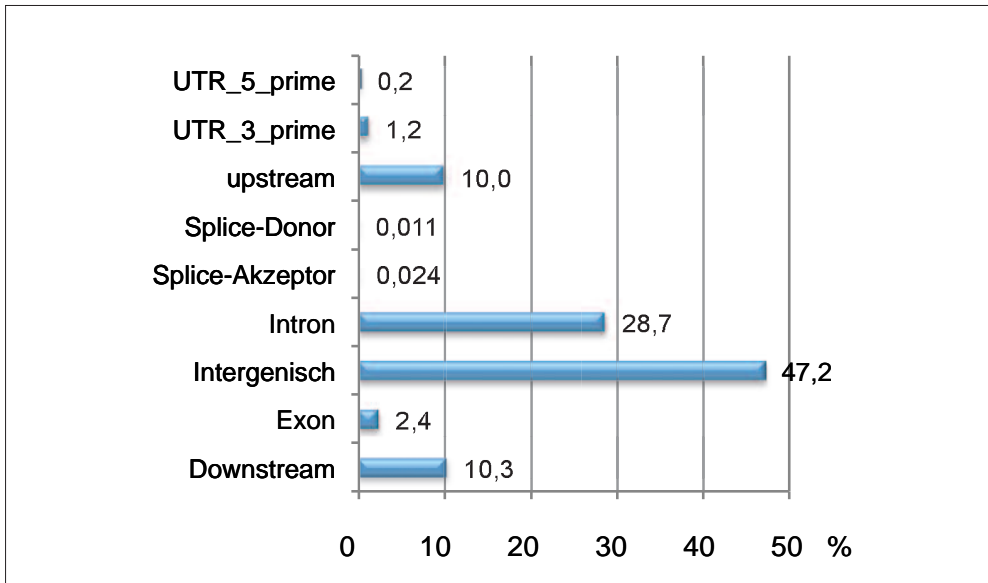


Abb. 3 Verteilung der identifizierten SNPs im Tilapia-genom auf verschiedene Effektklassen. Die Einteilung wurde mittels der Software SNPeff durchgeführt (CINGOLANI et al. 2012).

Etwa 29 % der Polymorphismen lagen in intronischen Bereichen. Lediglich 2,4 % der allelen Varianten lagen in exonischen Bereichen und stellten sogenannte *Missense*-Mutationen dar. Des Weiteren wurde ein Anteil von lediglich 0,011 und 0,024 % als das Spleißen von Genen beeinflussend charakterisiert.

7. Ausblick

Die in der vorliegenden Studie identifizierten Polymorphismen werden in weiteren Arbeiten auf statistisch signifikante Assoziationen mit der Ausprägung des phänotypischen Geschlechts bei erhöhten Aufzuchttemperaturen geprüft. Dabei werden neben familienspezifischen QTL-Kartierungen auch populationsweite Ansätze mit genomweiten Daten verfolgt. Weiterhin sind diese Polymorphismen eine wertvolle Ressource für die Identifikation fixierter Regionen im Genom von männlichen und weiblichen Tilapien, die auf die Entstehung von Geschlechtschromosomen hindeuten könnten.

Literatur

- BAIRD, N. A., ETTER, P. D., ATWOOD, T. S., CURREY, M. C., SHIVER, A. L., LEWIS, Z. A., SELKER, E. U., CRESKO, W. A., and JOHNSON, E. A.: Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLOS ONE* 3, e3376 (2008)
- BAROILLER, J.-F., CHOURROUT, D., FOSTIER, A., and JALABERT, B.: Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding Cichlid fish (*Oreochromis niloticus*). *J. Exp. Zool.* 273, 216–223 (1995)

- BAROILLER, J.-F., D'COTTA, H., BEZAULT, E., WESSELS, S., and HOERSTGEN-SCHWARK, G.: Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* *153*, 30–38 (2009)
- BAROILLER, J.-F., GUIGUEN, Y., and FOSTIER, A.: Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* *55/6*, 910–931 (1999)
- CINGOLANI, P., PLATTS, A., WANG, L. L., COON, M., NGUYEN, T., WANG, L., LAND, S. J., LU, X., and RUDEN, D. M.: A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* *6*, 80–92 (2012)
- CNAANI, A., and KOCHER, T. D.: Sex-linked markers and microsatellite locus duplication in the cichlid species *Oreochromis tanganycae*. *Biol. Lett.* *4*, 700–703 (2008)
- CNAANI, A., LEE, B.-Y., ZILBERMAN, N., OZOUF-COSTAZ, C., HULATA, G., RON, M., D'HONT, A., BAROILLER, J.-F., D'COTTA, H., PENMAN, D. J., TOMASINO, E., COUTANCEAU, J.-P., PEPEY, E., SHIRAK, A., and KOCHER, T. D.: Genetics of sex determination in tilapiine species. *Sex. Dev.* *2*, 43–54 (2008)
- CNAANI, A., ZILBERMAN, N., TINMAN, S., HULATA, G., and RON, M.: Genome-scan analysis for quantitative trait loci in an F2 tilapia hybrid. *Mol. Genet. Genomics* *272*, 162–172 (2004)
- D'COTTA, H., PEPEY, E., WESSELS, S., POONLAPHDECHA, S., REINELT, B., HOERSTGEN-SCHWARK, G., and BAROILLER, J.-F.: S10 – Sex differentiation in vertebrates. *Sex. Dev.* *2*, 279–289 (2008)
- DEVLIN, R. H., and NAGAHAMA, Y.: Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* *208*, 191–364 (2002)
- GUIGUEN, Y., FOSTIER, A., PIFERRER, F., and CHANG, C.-F.: Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* *165*, 352–366 (2010)
- HATTORI, R. S., OURA, M., SAKAMOTO, T., YOKOTA, M., WATANABE, S., and STRÜSSMANN, C. A.: Establishment of a strain inheriting a sex-linked SNP marker in Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*), a species with both genotypic and temperature-dependent sex determination. *Anim. Genet.* *41*, 81–84 (2010)
- IIRI, S., KANEKO, H., KOBAYASHI, T., WANG, D.-S., SAKAI, F., PAUL-PRASANTH, B., NAKAMURA, M., and NAGAHAMA, Y.: Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol. Reprod.* *78*, 333–341 (2008)
- KAMIYA, T., KAI, W., TASUMI, S., OKA, A., MATSUNAGA, T., MIZUNO, N., FUJITA, M., SUETAKE, H., SUZUKI, S., HOSOYA, S., TOHARI, S., BRENNER, S., MIYADAI, T., VENKATESH, B., SUZUKI, Y., and KIKUCHI, K.: A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLOS Genet* *8*, e1002798 (2012)
- KARAYÜCEL, İ., EZAZ, T., KARAYÜCEL, S., MCANDREW, B. J., and PENMAN, D. J.: Evidence for two unlinked “sex reversal” loci in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and for linkage of one of these to the red body colour gene. *Aquaculture* *234*, 51–63 (2004)
- KLUEVER, N., PFENNIG, F., PALA, I., STORCH, K., SCHLIEDER, M., FROSCHAUER, A., GUTZEIT, H. O., and SCHARTL, M.: Differential expression of anti-Müllerian hormone (*amh*) and anti-Müllerian hormone receptor type II (*amhrII*) in the teleost medaka. *Dev. Dyn. (an Off. Publ. Amer. Assoc. Anat.)* *236*, 271–281 (2007)
- KOBAYASHI, T., and NAGAHAMA, Y.: Molecular aspects of gonadal differentiation in a teleost fish, the Nile tilapia. *Sex. Dev.* *3*, 108–117 (2009)
- LANGMEAD, B.: Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinforma.* Chapter 11, Unit 117 (2010)
- LEE, B., and KOCHER, T. D.: Chapter 19. In: *Comparative Genomics and Positional Cloning*; pp. 325–337 (2005)
- LEE, B.-Y., LEE, W.-J., STREELMAN, J. T., CARLETON, K. L., HOWE, A. E., HULATA, G., SLETTAN, A., STERN, J. E., TERAI, Y., and KOCHER, T. D.: A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis spp.*). *Genetics* *170*, 237–244 (2005)
- LEE, B.-Y., PENMAN, D. J., and KOCHER, T. D.: Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Anim. Genet.* *34*, 379–383 (2003)
- LI, C. G., WANG, H., CHEN, H. J., ZHAO, Y., FU, P. S., and JI, X. S.: Differential expression analysis of genes involved in high-temperature induced sex differentiation in Nile tilapia. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* *177–178*, 36–45 (2014)
- LUEHMANN, L.-M., KNORR, C., HOERSTGEN-SCHWARK, G., and WESSELS, S.: First evidence for family-specific QTL for temperature-dependent sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sex. Dev.* *6*, 247–256 (2012)
- LUEHMANN, L.-M., SAMAVATI, S., WESSELS, S., and HOERSTGEN-SCHWARK, G.: The effect of temperature and hormone treatments during embryonic and post-larvae stages on sex differentiation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Poster Book of Abstracts of 10th International Symposium on Genetics in Aquaculture*. Bangkok, Thailand, June 22–26, 2009; p. 217 (2009)
- MATSUDA, M., NAGAHAMA, Y., SHINOMIYA, A., SATO, T., MATSUDA, C., KOBAYASHI, T., MORREY, C. E., SHIBATA, N., ASAKAWA, S., SHIMIZU, N., HORI, H., HAMAGUCHI, S., and SAKAIZUMI, M.: *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* *417*, 559–563 (2002)

- McKENNA, A., HANNA, M., BANKS, E., SIVACHENKO, A., CIBULSKIS, K., KERNYTSKY, A., GARIMELLA, K., ALTSHULER, D., GABRIEL, S., DALY, M., and DEPRISTO, M. A.: The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303 (2010)
- MUELLER-BELECKE, A.: Sex determination in tilapia (*Oreochromis niloticus*) sex ratios in homozygous gynogenetic progeny and their offspring. *Aquaculture* 137, 57–65 (1995)
- MYOSHO, T., OTAKE, H., MASUYAMA, H., MATSUDA, M., KUROKI, Y., FUJIYAMA, A., NARUSE, K., HAMAGUCHI, S., and SAKAIZUMI, M.: Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics* 191, 163–170 (2012)
- NAKAMURA, M., KOBAYASHI, T., CHANG, X. T., and NAGAHAMA, Y.: Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 281, 362–372 (1998)
- NANDA, I., KONDO, M., HORNING, U., ASAKAWA, S., WINKLER, C., SHIMIZU, A., SHAN, Z., HAAF, T., SHIMIZU, N., SHIMA, A., SCHMID, M., and SCHARTL, M.: A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11778–11783 (2002)
- PALAIOKOSTAS, C., BEKAERT, M., KHAN, M. G. Q., TAGGART, J. B., GHARBI, K., MCANDREW, B. J., and PENMAN, D. J.: Mapping and validation of the major sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using RAD sequencing. *PLOS ONE* 8, e68389 (2013)
- PALAIOKOSTAS, C., BEKAERT, M., KHAN, M. G., TAGGART, J. B., GHARBI, K., MCANDREW, B. J., and PENMAN, D. J.: A novel sex-determining QTL in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *BMC Genomics* 16, 1–10 (2015)
- PETERSON, B. K., WEBER, J. N., KAY, E. H., FISHER, H. S., and HOEKSTRA, H. E.: Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLOS ONE* 7, e37135 (2012)
- POONLAPHDECHA, S., PEPEY, E., CANONNE, M., VERDAL, H. DE, BAROILLER, J. F., and D’COTTA, H.: Temperature induced-masculinisation in the Nile tilapia causes rapid up-regulation of both *dmrt1* and *amh* expressions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 193, 234–242 (2013)
- POONLAPHDECHA, S., PEPEY, E., HUANG, S.-H., CANONNE, M., SOLER, L., MORTAJI, S., MORAND, S., PFENNIG, F., MÉLARD, C., BAROILLER, J. F., and D’COTTA, H.: Elevated *amh* gene expression in the brain of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) during testis differentiation. *Sex. Dev.* 5, 33–47 (2011)
- QUINN, A. E., SARRE, S. D., EZAZ, T., MARSHALL GRAVES, J. A., and GEORGES, A.: Evolutionary transitions between mechanisms of sex determination in vertebrates. *Biol. Lett.* 7, 443–448 (2011)
- SARRE, S. D., EZAZ, T., and GEORGES, A.: Transitions between sex-determining systems in reptiles and amphibians. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 12, 391–406 (2011)
- SARRE, S. D., GEORGES, A., and QUINN, A.: The ends of a continuum: Genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 26, 639–645 (2004)
- SCHARTL, M.: Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 634–641 (2004)
- SHIRAK, A., PALTI, Y., CNAANI, A., KOROL, A., HULATA, G., RON, M., and AVTALION, R. R.: Alleles and distorted sex ratios in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*). *J. Hered.* 97, 270–276 (2002)
- SHIRAK, A., SEROUSSI, E., CNAANI, A., HOWE, A. E., DOMOKHOVSKY, R., ZILBERMAN, N., KOCHER, T. D., HULATA, G., and RON, M.: *Amh* and *Dmrt2* genes map to tilapia (*Oreochromis spp.*) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination. *Genetics* 174, 1573–1581 (2006)
- SINCLAIR, A. H., BERTA, P., PALMER, M. S., HAWKINS, J. R., GRIFFITHS, B. L., SMITH, M. J., FOSTER, J. W., FRISCHAUF, A. M., LOVELL-BADGE, R., and GOODFELLOW, P. N.: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240–244 (1990)
- SMITH, C. A., ROESZLER, K. N., OHNESORG, T., CUMMINS, D. M., FARLIE, P. G., DORAN, T. J., and SINCLAIR, A. H.: The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature* 461, 267–271 (2009)
- TAO, W., YUAN, J., ZHOU, L., SUN, L., SUN, Y., YANG, S., LI, M., ZENG, S., HUANG, B., and WANG, D.: Characterization of gonadal transcriptomes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reveals differentially expressed genes. *PLOS ONE* 8, e63604 (2013)
- TESSEMA, M., MUELLER-BELECKE, A., and HOERSTGEN-SCHWARK, G.: Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture* 258, 270–277 (2006)
- WESSELS, S., and HOERSTGEN-SCHWARK, G.: Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. *Aquaculture* 272, S80–S87 (2007)
- WESSELS, S., and HOERSTGEN-SCHWARK, G.: Temperature dependent sex ratios in selected lines and crosses with a YY-male in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 318, 79–84 (2011)
- WESSELS, S., SHARIFI, R. A., LUEHMANN, L. M., RUEANGSRI, S., KRAUSE, I., PACH, S., HOERSTGEN-SCHWARK, G., and KNORR, C.: Allelic variant in the anti-müllerian hormone gene leads to autosomal and temperature-dependent sex reversal in a selected Nile tilapia line. *PLOS One* 9, e104795 (2014)

Geschlechtsdetermination bei der Fischart Tilapia (Oreochromis niloticus)

YANO, A., GUYOMARD, R., NICOL, B., JOUANNO, E., QUILLET, E., KLOPP, C., CABAU, C., BOUCHEZ, O., FOSTIER, A., and GUIGUEN, Y.: An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr. Biol.* 22, 1423–1428 (2012)

Dr. Stephan WESSELS
Department für Nutztierwissenschaften
Abteilung für Aquakultur und Gewässerökologie
Georg-August-Universität Göttingen
Albrecht-Thaer-Weg 3
37075 Göttingen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 551 395606
Fax: +49 551 395587
E-Mail: swessel@gwdg.de

Strahlenforschung in der Medizin – Relevanz und Perspektiven

Leopoldina-Symposium
am 8. und 9. Mai 2015 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 121, Nr. 406

Herausgegeben von Karl-Jürgen WOLF (Berlin), Wolfram H. KNAPP (Hannover) und
Thomas HERRMANN (Dresden)

(2016, 346 Seiten, 89 Abbildungen, 7 Tabellen, 27,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3512-5)

Die Strahlenmedizin mit ihren vielfältigen diagnostischen und therapeutischen Methoden hat in Deutschland einen im internationalen Vergleich hervorragenden Stand. Davon profitieren Patienten und die medizintechnische Industrie. Der Band gibt einen Überblick zu Fortschritten von bildgebender Diagnostik, interventioneller Radiologie und therapeutischer Strahlenmedizin. Neben allgemeinen Fragen der Strahlenanwendung in Krankenversorgung und medizinischer Forschung werden die aktuellen Entwicklungen der verschiedenen Verfahren (u. a. Magnetresonanztomographie, Computertomographie, Positronenemissionstomographie) und moderne Radiotherapien vorgestellt sowie der Einsatz von Radiopharmaka und *In-vivo*-Biomarkern behandelt. Ein besonderer Fokus liegt auf Anwendungen in Onkologie (Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Neuroonkologie), Kardiologie und Neurologie.

Paternale Wirkung von IGF2-Gen-Varianten auf Produktionsmerkmale von Schweinerassen in Russland

Olga KOSTJUNINA,¹ Natalia ZINOVIEVA,¹ Lutz PLOBNER²
und Gottfried BREM³ ML, WM ÖAW

Zusammenfassung

IGF-2 (insulinähnlicher Wachstumsfaktor-2) ist auf Grund seiner chromosomalen Lokalisation und paternalen Expression, seiner Auswirkungen auf die Myogenese und der Beteiligung an einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen und Differenzierungsprozessen als genetischer Marker interessant.

Polymorphismen vom IGF2-Gen wurden bei Schweinen russischer, weißrussischer, kanadischer und europäischer Abstammung untersucht. Für kommerzielle Rassen und Kreuzungen sind hohe Frequenzen des Allels A und der AA-Genotypen charakteristisch. Besonders hohe Frequenzen des gewünschten Allels A (70 bis 100 %) wurden in *Duroc*-europäischen und kanadischen Ursprungs und *Yorkshire*-Schweinerassen gefunden. Geringe Häufigkeit des A-Allels und der AA-Genotypen in russischen und weißrussischen Schweinen sind wahrscheinlich eine Folge der bevorzugten Selektion nach Fruchtbarkeitskriterien in dieser Rasse und der fehlenden BLUP-Zuchtwertschätzung.

Bei der Untersuchung von wirtschaftlich wertvollen Eigenschaften von Schweinen und deren Nachkommen auf Basis von IGF2-Gen-Varianten zeigte sich, dass Individuen mit dem AA-Genotyp und ihre Nachkommen signifikant niedrigere Rückenspeckdicken (bis zu 2 bis 7 mm) haben, eine größere Wachstumsrate aufweisen und weniger Futterkosten verursachen. Diese Tiere hatten eine größere Rückenmuskelfläche (Differenzen betragen bis zu 12,5 cm²). Bei der Bewertung der Produktivität von mehr als 5000 Nachkommen, die von verschiedenen Vätern stammten und verschiedene Genotypen dieses Markers aufwiesen, zeigte sich, dass 1000 Schlachtschweine mit dem Genotyp AA 8,7 t mehr Lebendgewicht und 6,1 t mehr Schlachtkörper lieferten als solche mit Genotyp GG.

Abstract

IGF-2 (insulin-like growth factor-2) is a potentially useful genetic marker based on its chromosomal localization, its paternal expression, and its effects on myogenesis. Furthermore, it is involved in several metabolic and differentiation processes. Commercial pig breeds and their hybrids are characterized by high frequencies of the allele A and an AA genotype.

Polymorphisms of the IGF2 gene were investigated in pig breeds of Russian, Belarussian, Canadian, and European origin. Particular high frequencies of the desired A allele (70–100 %) were found in *Duroc* breeds of European and Canadian origin and in *Yorkshire* breeds. In contrast, lower frequencies of the A allele and the AA genotype were identified in Russian and Belarussian pigs and are interpreted as a result of the preferred selection of fertility criteria in that breed and due to the lack of a BLUP genetic evaluation.

The investigation of economically valuable traits in pigs and their offspring that is based on IGF2 gene variants showed a significantly higher growth rate, a lower backfat thickness (up to 2–7 mm), and reduced feeding costs in individuals with the AA genotype. These animals had also an increased back muscle area (differences ≤ 12.5 cm²). Assessing the productivity of > 5,000 offspring of different boars carrying different IGF2 genotypes, showed that 1000 pigs with AA genotype generated an additional 8.7 t of liveweight and an additional 6.1 t of meat compared to the wild-type GG genotype.

1 L.-K.-Ernst-Institut für Tierzucht, 142132 Moskauer Gebiet, St. Podolsk, Siedl. Dubrovitzky, H.60 (Russland).

2 Agrobiogen GmbH, Larezhhausen 2–3, 86567 Hilgertshausen.

3 Institut für Tierzucht und Genetik, VMU, Veterinärplatz 1, A-1210, Wien (Österreich).

1. Einleitung

Auf der Suche nach *Quantitative Trait Loci* (QTLs), die für die Unterschiede im Wachstum und die Fetteinlagerung verantwortlich sind (siehe auch ANDERSSON et al. 1994, ANDERSSON-EKLUND et al. 1998) wurde ein Locus gefunden, der Muskelentwicklung, Fettablagerungen und Herzgröße beeinflusst.

Dieser Locus befindet sich auf dem distalen Ende des Schweinechromosoms 2p (SSC2p) und hat paternale Wirkung. IGF-2 (insulinähnlicher Wachstumsfaktor-2) wurde wegen seiner chromosomalen Lokalisation, seiner paternalen Expression, seiner Auswirkungen auf die Myogenese und wegen seiner Beteiligung an einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen und Differenzierungsprozessen als Gen-Kandidat vorgeschlagen. Von dänischen Wissenschaftlern durchgeführte Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Mutation des IGF2-Gens an Position 3072 (G → A) die Wachstumsrate und die Fettablagerung bei Schweinen erheblich beeinflusst (VAN LAERE et al. 2003). Es wurde gefunden, dass dieses Gen paternale Wirkung auf die Produktivität hat.

Dies bedeutet, dass sich bei den Nachkommen nur das Allel ausprägt, welches vom Vater stammt. Der paternale Effekt des Gens erleichtert die Entwicklung von Zuchtstrategien wesentlich, weil es für das Erreichen eines positiven Effekts bei den Nachkommen genügt, nur die Eber zu testen und zu screenen. Der Einfluss von Genvarianten des IGF-2 auf die Fettablagerung und das Wachstum von Muskelgewebe sowohl bei reinrassigen Schweinen (JEON et al. 1999, NEZER et al. 1999, DE KONING et al. 2000), als auch bei verschiedenen experimentellen Kreuzungen und kommerziellen Populationen (JUNGERIUS et al. 2004, ESTELLE et al. 2005, HEUVEN et al. 2005) wurde gezeigt.

Die Schweine, die das Allel A vom Vater geerbt haben, haben eine niedrigere Rückenspeckdicke, mehr mageres Fleisch und einen 3 bis 4 % höheren Fleischanteil des Schlachtkörpers im Vergleich zu Schweinen mit dem G-Allel. Nach Angaben des kanadischen Zentrums für Entwicklung der Schweinezucht (CCSI) hatten Schweine mit dem Genotyp AA eine 7,1 mm geringere Rückenspeckdicke, 4,3 % mehr mageres Fleisch, eine um 7,4 mm höhere Muskelstärke und eine 7,2 cm² größere Rückenmuskelfläche im Vergleich zu Schweinen mit dem Genotyp GG.

2. Ergebnisse

Im Zentrum für Molekulare Diagnostik des Forschungsinstituts für Tierzucht wurde ein Testsystem auf der Grundlage einer PCR-RFLP-Analyse erarbeitet, das eine Bestimmung der IGF2-Gen-Varianten an Position G3072A ermöglicht. Die Untersuchung des Gen-Polymorphismus von IGF-2 wurde an 73 Schweinegruppen mit 3215 Tieren durchgeführt. Die Tabelle 1 zeigt die Häufigkeitsverteilung der IGF2-Allele bei den Schweinen verschiedener Rassen.

Bei kommerziellen Rassen und Kreuzungen kommen das Allel A und der Genotyp AA häufig vor. Besonders hohe Frequenzen des gewünschten Allels A (70 %–100 %) wurden in der Schweinerasse *Duroc* europäischen und kanadischen Ursprungs und in der Rasse *Yorkshire* gefunden. Dies ist offensichtlich die Folge der Intensivzucht auf Fleisch- und Mastmerkmale. Bei Schweinen der Mutterrassen *Large White* und *Landrasse* ist Allel A mit entsprechend $53,17 \pm 1,0\%$ und $23,66 \pm 1,0\%$ viel seltener (Abb. 1).

Tab. 1 Die Häufigkeitsverteilung von Allelen und Genotypen des IGF2 bei Schweinen verschiedener Rassen

Schweine- rasse	Anzahl der Tiere	Anzahl der Gruppen	Häufigkeit des Allels			Verteilung der Genotypen		
			Min	A (q _A) Max	im Durch- schnitt	AA	AG	GG
Large White und Yorkshire	1247	26	0,020	1,00	0,664	53,17±1,00	26,54±1,00	20,29±1,00
Landrasse	934	21	0,00	1,00	0,363	23,66±1,00	25,27±1,00	51,07±1,00
Duroc	642	17	0,786	1,00	0,960	92,06±1,00	7,94±1,00	0,00
Pietrain	87	3	0,946	1,00	0,966	93,10±2,00	6,90±2,00	0,00
Terminal	66	2	0,938	0,990	0,977	95,45±2,00	4,55±2,00	0,00
Weiß-russisches Fleischschwein	37	1	0,338	0,338	0,338	24,32	18,92	56,76
Body	138	1	0,986	0,986	0,986	97,10	2,90	0,00
Livenskaya	54	1	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00	100,00
Estonian Specks	10	1	0,250	0,250	0,250	10,00	30,00	60,00

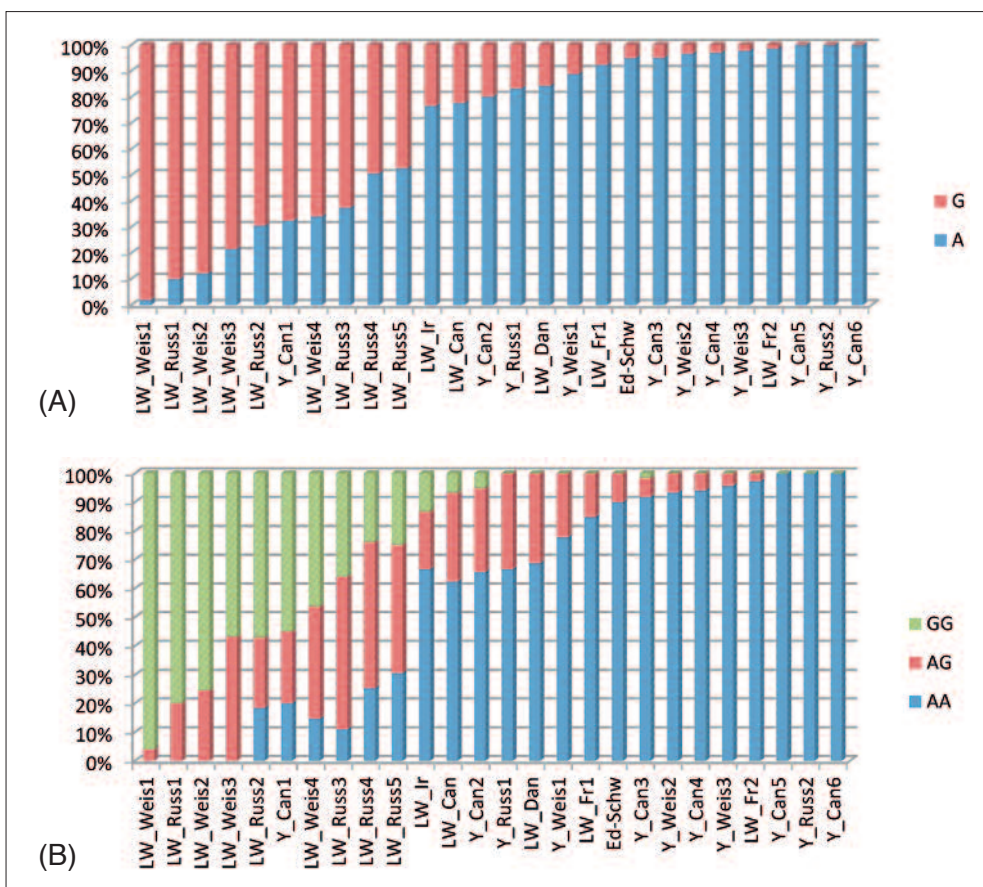


Abb. 1 Häufigkeit der Allele und Genotypen des IGF2-Gens in den Rassen *Large White* und *Yorkshire*

Eine hohe Frequenz von Allel A wurde in *Yorkshire* französischer Zucht gefunden. Diese Gruppe von *Yorkshire* weicht im Fleischtyp phänotypisch stark ab und ist in der Fruchtbarkeit beeinträchtigt. Geringe Häufigkeit des A-Allels und niedrige AA-Genotyp-Frequenz in russischen und weißrussischen Schweinen sind wahrscheinlich eine Folge der bevorzugten Selektion auf Fruchtbarkeitskriterien und der fehlenden BLUP⁴-Zuchtwertschätzung in dieser Rasse.

In Schweinen der Rasse *Duroc*, die im letzten Stadium der kommerziellen Kreuzung verwendet und nach Fleisch- und Mastleistungsmerkmalen selektiert werden, tritt das Allel A besonders häufig auf (Abb. 2). Außerdem wurde in Schweinegruppen europäischer und kanadischer Selektion, die nach Russland eingeführt wurden, das Allel G identifiziert,

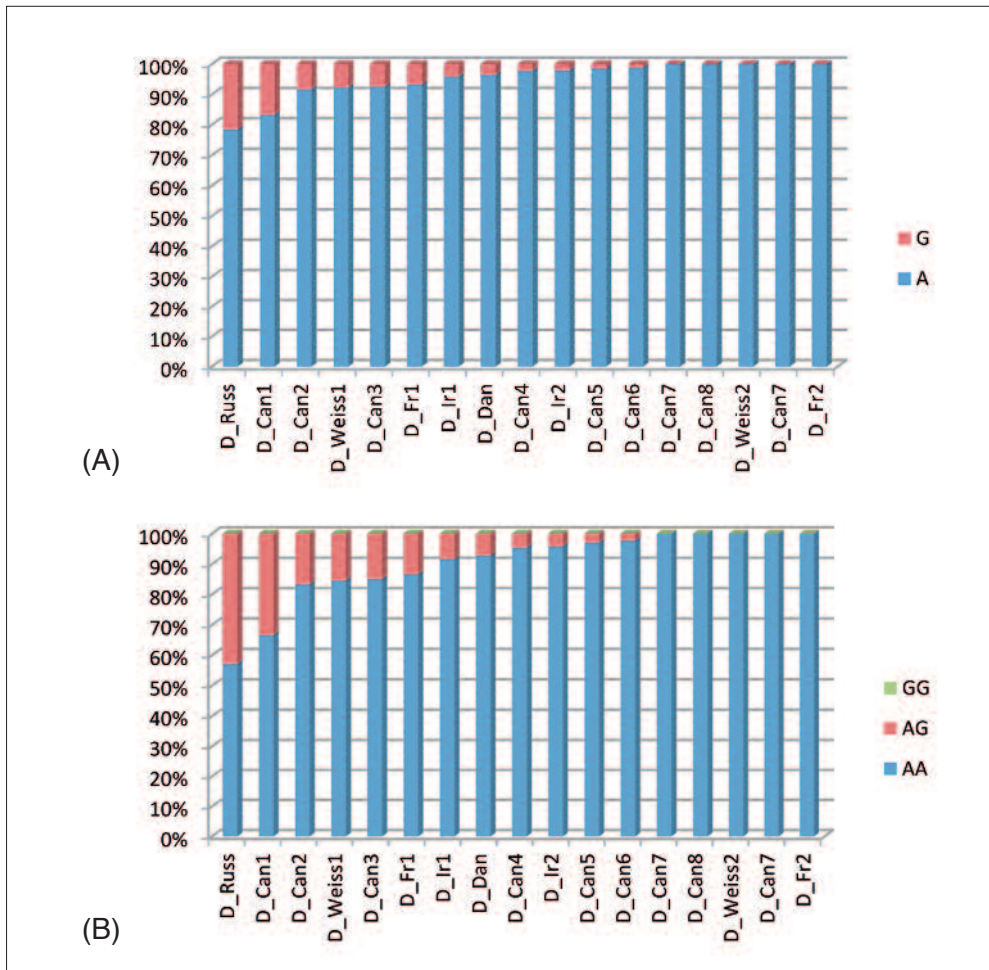


Abb. 2 Häufigkeit der Allele und Genotypen des IGF2-Gens in der Rasse *Duroc*

⁴ BLUP – Best Linear Unbiased Prediction.

dessen Häufigkeit wachsen kann, wenn keine starke Selektion auf Bemuskelung stattfindet.

Landrasse ist durch geringe Häufigkeit des Allels A und des AA-Genotyps gekennzeichnet, wobei bei der Mehrheit der Gruppen von Schweinen kanadischer und europäischer Herkunft Allel A und AA-Genotyp häufiger auftritt als bei *Landrasse* russischer und weißrussischer Herkunft (Abb. 3). Dies ist, wie bei der Rasse Yorkshire, auf die stärkere Selektion auf Fruchtbarkeit bei den russischen Schweinen zurückzuführen.

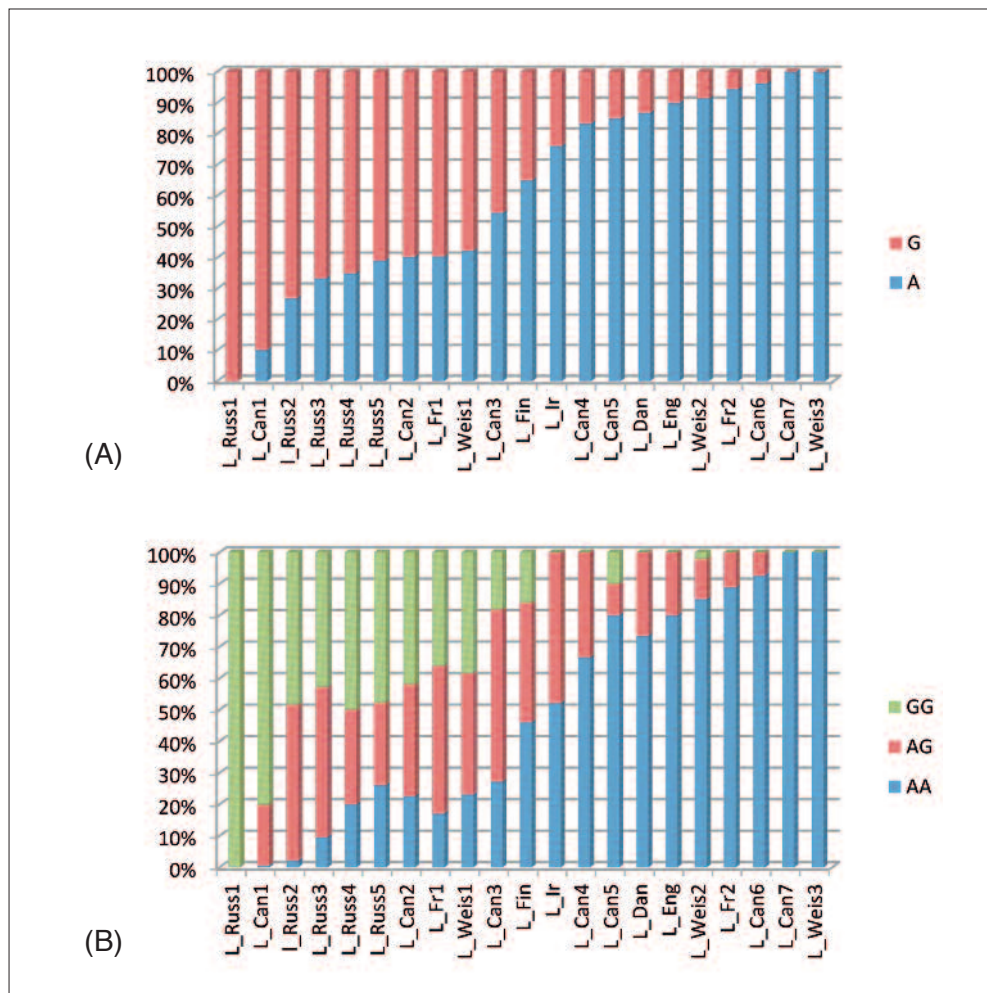


Abb. 3 Häufigkeit der Allele und Genotypen des IGF2-Gens in der Rasse *Landrasse*

Die Frequenzanalyse der IGF2-Gen-Varianten bei Schweinen hat gezeigt (Abb. 4), dass die terminalen Zuchtlinien sowie die Rassen *Pietrain* und *Body* überwiegend den AA-Genotyp tragen. Bei lokalen Schweinen der weißrussischen Fleischrasse und der estnischen Speckrasse

lag die Frequenz von Allel A bei 0,338 bis 0,250. Bei Schweinen der lokalen russischen Rasse *Livenskaja* fehlt Allel A.

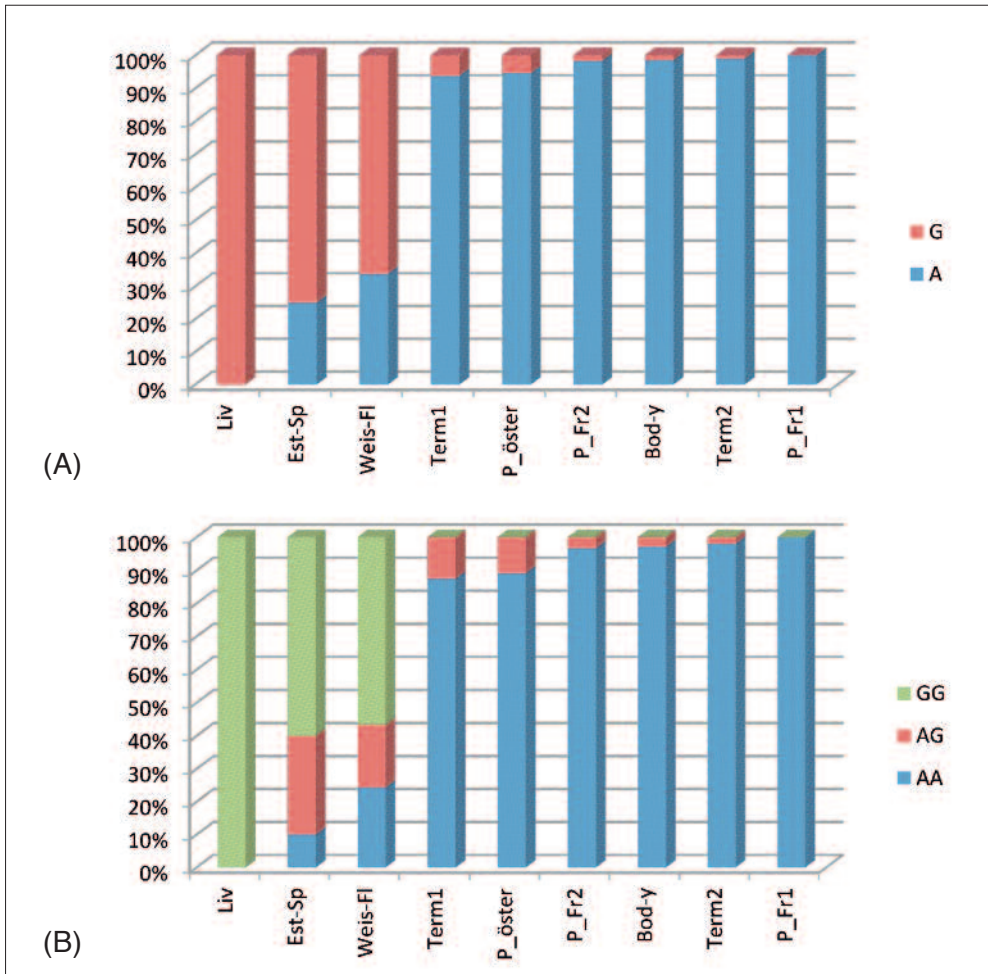


Abb. 4 Häufigkeit der Allele und Genotypen des IGF2-Gens in verschiedenen Rassen

Wir untersuchten die Produktivität der Elterntiere und die Produktivität ihrer Nachkommen unter Berücksichtigung der Genvarianten des IGF-2. Die folgenden Abbildungen zeigen Diagramme für die verschiedenen Leistungsmerkmale.

Schweine mit der Gen-Variante AA bei der weißrussischen Fleischrasse erreichten das 100 kg-Lebendmasse-Alter 6 bis 7 Tage und bei Kreuzungen von *Large White* und *Canadian Landrasse* 19 Tage früher (bei $p \leq 0,05$ bis $0,01$). Schweine, deren Väter einen homozygoten AA-Genotyp haben, zeigten eine tendenziell höhere durchschnittliche Tageszunahme. Außerdem verbrauchten sie für das Wachstum um 0,14 bis 0,25 Futtereneinheiten weniger. Die Rückenmuskelfläche bei Schweinen mit AA-Genotyp war größer. Der Unterschied betrug bis zu $12,5 \text{ cm}^2$ (bei $p \leq 0,01$).

Wir haben bei den untersuchten Genotyp-Gruppen von Schweinen signifikante Unterschiede der Rückenspeckdicke festgestellt, wobei bei der weißrussischen *Große Weiße*-Rasse die Unterschiede 2 bis 7 mm betragen. In Bezug auf seine paternale Wirkung auf die Fleischproduktivität der Nachkommen ist das IGF2-Gen somit für die Züchter von großem Interesse.

Bei der Bewertung der Produktivität von mehr als 5000 Nachkommen (Abb. 5), die von verschiedenen Vätern stammten und verschiedene Genotypen dieses Markers aufwiesen, zeigte sich, dass 1000 Schlachtschweine mit dem Genotyp AA 8,7 t mehr Lebendmasse und 6,1 t mehr Fleisch lieferten als Tiere mit dem Genotyp GG.

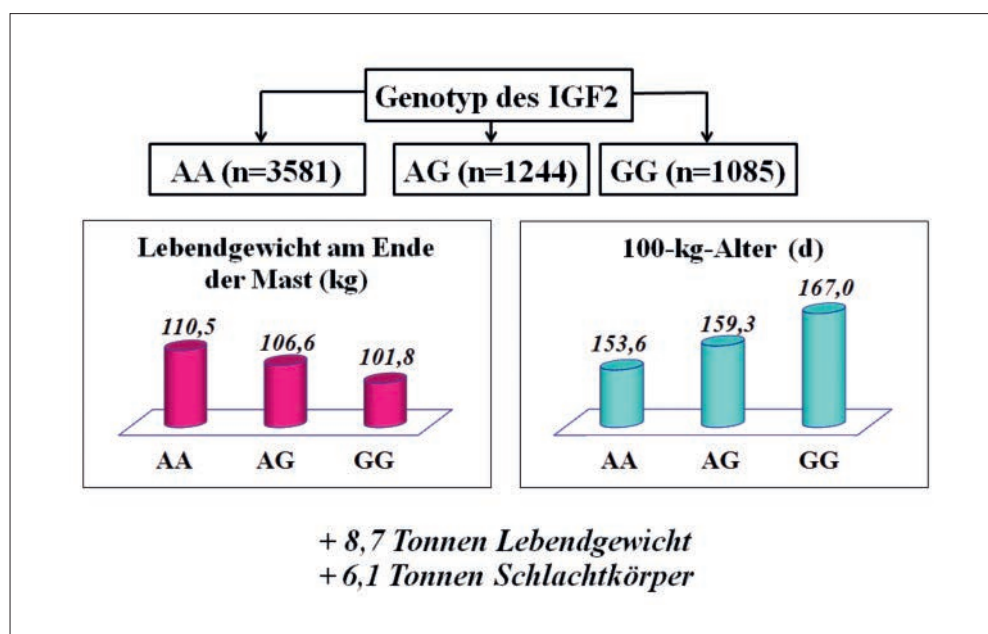


Abb. 5 Effizienz von Schweinen mit verschiedenen Genotypen des DNA-Markers IGF2 (für Väter)

Unter Berücksichtigung der Erhöhung der durchschnittlichen Tageszunahme von mehr als 80 g wurde der Genotyp des IGF2 in Russland als zusätzliches Kriterium für die Auswahl der Zuchteber eingeführt.

Literatur

- ANDERSSON, L., HALEY, C. S., ELLEGREN, H., KNOTT, S. A., JOHANSSON, M., ANDERSSON, K., ANDERSSON-EKLUND, L., EDFORS-LILJA, I., FREDHOLM, M., HANSSON, I., HAKANSSON, J., and LUNDSTRÖM, K.: Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 263, 1771–1774 (1994)
- ANDERSSON-EKLUND, L., MARKLUND, L., LUNDSTROM, K., HALEY, C. S., ANDERSSON, K., HANSSON, I., MOLLER, M., and ANDERSSON, L.: Mapping quantitative trait loci for carcass and meat traits in a Wild boar × Large White intercross. *J. Anim. Sci.* 76, 694–700 (1998)
- DE KONING, D. J., RATTINK, A. P., HARLIZIUS, B., VAN ARENDONK, J. A. M., BRASCAMP, E. W., and GROENEN, M. A. M.: Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7947–7950 (2000)

- ESTELLE, J., MERCADE, A., NOGUERA, J. L., PEREZ-ENCISO, M., OVILO, C., SANCHEZ, A., and FOLCH, J. M.: Effect of the porcine IGF2-intron3-G3072A substitution in an outbred Large White population and in an Iberian × Landrace cross. *J. Anim. Sci.* *83*, 2723–2728 (2005)
- HEUVEN, H. C. M., and BOVENHUIS, H.: Effect of IGF2 on growth characteristics of F2 Meishan × White. Proceedings of 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 5–8 June 2005, Uppsala (2005)
- JEON, J. T., CARLBORG, O., TORNSTEN, A., GIUFFRÀ, E., AMARGER, V., CHARDON, P., ANDERSSON-EKLUND, L., ANDERSSON, K., HANSSON, I., LUNDSTROM, K., and ANDERSSON, L.: A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nature Genet.* *21*, 157–158 (1999)
- JUNGERIUS, B. J., VAN LAERE, A. S., TE PAS, M. F., VAN OOST, B. A., ANDERSSON, L., and GROENEN, M. A.: The IGF2-intron3-G3072A substitution explains a major imprinted QTL effect on backfat thickness in a Meishan × European white pig intercross. *Genet. Res.* *84*, 95–101 (2004)
- NEZER, C., MOREAU, L., BROUWERS, B., COPPIETERS, W., DETILLEUX, J., HANSET, R., KARIM, L., KVASZ, A., LEROY, P., and GEORGES, M.: An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nature Genet.* *21*, 155–156 (1999)
- VAN LAERE, A. S., NGUYEN, M., BRAUNSCHWEIG, M., NEZER, C., COLLETTE, C., MOREAU, L., ARCHIBALD, A. L., HALEY, C. S., BUYS, N., TALLY, M., ANDERSSON, G., GEORGES, M., and ANDERSSON, L.: A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* *425*, 832–836 (2003)

Dr. Olga KOSTJUNINA
All-Russian State Research Institute
of Animal Breeding of the Russian Academy
of Agricultural Science
Dubrovitsy settlement 60
Podolsk District
142132 Moscow Region
Russia
Tel.: +7 4967 651404
Fax: +7 4967 651151
+7 4967 651101
E-Mail: kostolan@mail.ru

Geschlechtsspezifische maternale Effekte endokriner Disruptoren auf die postnatale Entwicklung

David KRADOLFER, Veronika L. PISTEK und Susanne E. ULBRICH
(Zürich, Schweiz)

Zusammenfassung

Organismen sind einer ganzen Reihe von Substanzen, sogenannten Endokrinen Disruptoren (ED), ausgesetzt, die mit dem endogenen System interferieren. Das stellt den Körper vor regulatorische Herausforderungen, die zu Erkrankungen führen können. Eine molekulare Erklärung hierfür liegt in der epigenetischen Beeinflussung der Gentranskription. Die Auswirkungen der ED sind außer von der konkreten Substanz auch von der Spezies, den Dosen, dem Zeitfenster der Exposition, der Wirkdauer und den Wirkorten, aber auch dem Geschlecht des betroffenen Organismus abhängig. Hier werden geschlechtsspezifische Effekte der ED vorgestellt und deren Wirkungsmechanismen an Beispielen diskutiert.

Abstract

Organisms are exposed to a series of substances – so called endocrine disrupters (ED) – that interfere with the endogene system. This challenges the body and may give rise to diseases. Epigenetic influence of gene transcription is one of the molecular explanations. Except for the concrete substance, effects of ED depend on species, doses, exposure duration, duration of action, sites of action and gender. We present gender-specific effects of ED and discuss by giving examples their mechanisms of action.

1. Einleitung

Die gesunde Entwicklung und Fortpflanzung von Mensch und Tier ist abhängig von einem normal funktionierenden endokrinen System. Im täglichen Leben ist der Körper einer ganzen Reihe von Substanzen ausgesetzt, deren Potenzial, mit dem endogenen System zu interferieren, vermutet wird bzw. nachgewiesen worden ist. Dies stellt den Körper vor regulatorische Herausforderungen, die eine Reihe von Erkrankungen bedingen können. Beobachtungen zeigen, dass diese sogenannten Endokrinen Disruptoren (ED) neben direkten adversen Effekten auch Erkrankungen hervorrufen können, die erst zu einem viel späteren Zeitpunkt in Erscheinung treten. Eine molekulare Erklärung hierfür liegt in der epigenetischen Beeinflussung der Gentranskription. Die kausalen Zusammenhänge zwischen ED und dem Auftreten von Erkrankungen sind nur unbefriedigend geklärt, weil sich Spezies, Dosen, Substanzen, Zeitfenster der Exposition, Wirkdauer, Wirkorte und Ebenen der Analytik zwischen den Studien unterscheiden, diese aber offenbar einen großen Einfluss auf das Interaktionspotential von ED mit dem endokrinen System haben. Hierzu zählt auch das Geschlecht des Organismus, welches von der Wirkung der ED betroffen ist. Im Folgenden werden geschlechtsspezifische Effekte von ED vorgestellt und deren mögliche Wirkungsmechanismen erörtert.

2. Endokrine Disruptoren

Die WHO/UNEP definiert Endokrine Disruptoren (ED) als „[...] eine exogene Substanz, welche die Funktion des endokrinen Systems verändert und als Folge davon negative gesundheitliche Folgen auf einen intakten Organismus oder seine Nachkommen hat.“ (WHO-UNEP 2012.) Es gibt eine Vielzahl von Stoffen, welche mittlerweile als ED bestätigt wurden. Beispiele sind langlebige organische Schadstoffe (POPs, *persistent organic pollutants*) wie z. B. Polychlorierte Biphenyle (PCB), weniger langlebige Chemikalien wie Weichmacher (z. B. Bisphenol A) oder Phtalate, aber auch Pestizide (z. B. Vinclozolin, Atrazin), Medikamente (z. B. Diethylstilbestrol), Metalle (z. B. Arsen), Phytoöstrogene (z. B. Isoflavonoide) sowie natürliche Hormone wie 17β -Estradiol (WHO-UNEP 2012). Diese ED können von Menschen über die Nahrung, Getränke, die Atmung oder direkt über die Haut aufgenommen werden (VANDENBERG et al. 2007). So wird beispielsweise Bisphenol A (BPA) in Plastikflaschen und Konservendosen eingesetzt, von wo aus es in die Nahrung gelangen kann. Ebenso wird BPA für Thermopapier verwendet, aus welchem es vermutlich über die Haut in den Körper eindringen kann (ZALCO et al. 2011). In über 90 % der westlichen Bevölkerung kann BPA im Urin nachgewiesen werden (VANDENBERG et al. 2007).

Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit ist es nicht immer möglich, eine endokrin disruptierende Wirkung auf Grund der Struktur einer Chemikalie vorauszusagen. ED, wie z. B. BPA, Diethylstilbestrol oder Phytoöstrogene, interferieren mit Östrogenrezeptoren ($ER\alpha$ oder $ER\beta$) oder greifen in die Synthese und den Metabolismus der Sexualsteroiden ein. Viele ED (z. B. Phytoöstrogene) sind selektiv und binden stärker an $ER\beta$. ER werden auch von anderen Transkriptionsfaktoren wie dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) reguliert, die die Aktivität von ER modulieren (MATTHEWS und GUSTAFSSON 2006). ED wirken über verschiedene Mechanismen, die teils einen gegenteiligen Effekt haben, was es schwierig macht, den Effekt eines ED abzuschätzen. So wurde in der Milchdrüse (PARUTHIYIL et al. 2004, STROM et al. 2004) und im Uterus (MORANI et al. 2008) gezeigt, dass Östrogensignalling *via* $ER\alpha$ einen proliferativen Effekt hat, während es *via* $ER\beta$ genau das Gegenteil bewirkt.

Solche gegenteilige Effekte sind auch eine der möglichen Ursachen für das Phänomen der nicht monotonen Dosis-Antwort (NMDR, *non monotonic dose response*). Normalerweise geht man in der Toxikologie davon aus, dass ein Stoff in einem Organismus ab einem gewissen Schwellenwert eine Wirkung hat, welche sich mit einer Erhöhung der Dosis verstärkt. Bei einer NMDR ist dies nicht der Fall, beispielsweise hat eine Substanz bei höherer Dosis keinen Effekt, bei einer geringeren Dosis jedoch deutlich (bzw. sie hat einen Effekt auf andere Endpunkte), es entsteht z. B. eine Kurve in Form eines U oder eines umgekehrten U. Solche NMDR wurden für viele ED gezeigt (VANDENBERG et al. 2012) und sind für die Einschätzung der Wirksamkeit eines ED von großer Bedeutung. Für die Risikobeurteilung eines Stoffes wird von Organisationen wie dem *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) jeweils die Dosis bestimmt, bei welcher sie keinen Effekt hat, das *no observed effect level* (NOEL). 1 % dieser Menge wird dann zur für den Menschen sicheren Dosis, dem *acceptable daily intake* (ADI)-Level (oder *tolerable daily intake*, TDI) erklärt. Durch das Auftreten von NMDRs ist dieses Vorgehen jedoch problematisch, da Effekte von geringen Dosen übersehen werden können. Ebenfalls ein wichtiger Punkt ist die zur Bestimmung des NOEL verwendete Personengruppe. Im Falle von Estradiol- 17β (E_2) hat die JECFA einen Wert von $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ in postmenopausalen Frauen errechnet (JECFA 1999). Da jedoch beispielsweise Knaben vor der Pubertät sehr viel niedrigere Östradiolspiegel haben, ist es fragwürdig, daraus einen ADI für die gesamte Bevölkerung zu errechnen.

Neben der Dosis ist besonders der Zeitpunkt der Exposition gegenüber einem ED entscheidend. Während der Fetalentwicklung ist der Organismus besonders anfällig für veränderte Hormonbedingungen. So konnte man zeigen, dass sich bei Mehrlingsgeburten die einzelnen Feten durch ihre eigene Hormonproduktion gegenseitig beeinflussen. Beispielsweise ist in weiblichen Mäusen, die im Uterus zwischen zwei Männchen platziert sind, die Testosteronkonzentration leicht erhöht. Nach der Geburt entwickeln diese Tiere ein aggressiveres Verhalten als Weibchen, die sich zwischen zwei Weibchen entwickelten. Es gibt eine Vielzahl von Hinweisen, dass solche Effekte auch bei menschlichen Zwillingspaaren vorkommen (VANDENBERG et al. 2012). Die perikonzeptionelle, embryonale, fetale und postnatale Periode der Entwicklung scheint besonders für die Wirkung von ED anfällig. Einer der ersten entdeckten ED war Diethylstilbestrol (DES), welches früher während der Schwangerschaft als Medikament eingesetzt wurde. Bei Frauen, welche als Fetus *in utero* DES ausgesetzt waren, wurde ein erhöhtes Risiko für eine Vielzahl an Krankheiten nachgewiesen (HOOVER et al. 2011). Solche langfristigen Effekte beruhen auf epigenetischer Programmierung.

3. Endokrine Disruptoren und Epigenetik

Epigenetische Modifikationen der DNA und der Histonproteine bestimmen, welche Gene in einer Zelle aktiv sind. Im Gegensatz zu genetischen Veränderungen bleibt die Sequenz der DNA dabei unverändert. Neben der DNA-Methylierung können auch Histone modifiziert vorliegen und die Transkription beeinflussen. Der Histon-Code ist derzeit aufgrund der großen Anzahl an möglichen Modifikationen nicht so eindeutig charakterisiert wie der DNA-Code. Es gibt jedoch Modifikationen, die meistens mit aktiven Genen assoziiert sind, z. B. Trimethylierung von Lysin 4 an Histon H3 (H3K4me3), während andere meistens mit Repression korrelieren, z. B. Trimethylierung von Lysin 27 an Histon H3 (H3K27me3).

Was ist nun der Zusammenhang zwischen Epigenetik und ED? Ein ED kann beispielsweise *via* Regulation der Östrogenrezeptoren die Aktivität von Genen kurzfristig regulieren oder in Zusammenhang mit der Methylierung der DNA stehen (FURST et al. 2012). Insbesondere wenn die Exposition zum ED während der Fetalentwicklung geschieht, kann man oftmals langanhaltende Effekte beobachten, selbst nachdem der ED entfernt wurde. Folglich hat der ED zu epigenetischen Veränderungen geführt, welche dann unabhängig vom ED auf zellulärer Ebene weitervererbt wurden (unter bestimmten Umständen auch transgenerationell). Aus biologischer Sicht bereitet sich der Embryo mit dieser Programmierung auf die Umweltbedingungen vor, unter denen er später leben wird. Wenn während der Schwangerschaft ein Mangel an Nahrung herrscht, dann wird der Fetus darauf programmiert, möglichst effizient mit den Ressourcen umzugehen. Im späteren Leben kann das dazu führen, dass schneller Reserven angesetzt werden.

Studien an Säuglingen, die während des Holländischen Hungerwinters (1944–1945) geboren wurden, zeigen, dass maternale Unterernährung zu einer verkleinerten Plazenta führt, wobei dieser Effekt bei Jungen stärker war als bei Mädchen (ROSEBOOM et al. 2011). Außerdem veränderte sich bei Jungen, nicht aber bei Mädchen, die Beziehung zwischen der Größe der Plazenta und dem späteren Auftreten von Bluthochdruck. Dieser korrelierte bei normaler maternaler Ernährung mit einer Verkleinerung der Plazenta, während der Hungersnot jedoch mit einer Vergrößerung der Plazenta (VAN ABELEN et al. 2011).

Bisher gibt es erst wenige Studien, welche den Einfluss von ED auf die Plazenta untersuchten. Für BPA wurde unter anderem gezeigt, dass es die microRNA-Expression in Plazen-

tazellen (AVISSAR et al. 2010) und geprägte Gene in der Plazenta von Mäusen verändert (SUSIARJO et al. 2013). TAKEDA et al. zeigen, dass die Plazenta die stärkste *Estrogen-related receptor gamma* (ERR γ)-Expression aller Fortpflanzungsgewebe im Menschen aufweist (TAKEDA et al. 2009). Dieser Rezeptor bindet sehr stark an BPA und ist möglicherweise für die Wirkung sowie die Akkumulation von BPA in der Plazenta verantwortlich.

4. Endokrine Disruptoren und geschlechtsspezifische Effekte

Da sich männliche und weibliche Feten in verschiedenen Aspekten unterscheiden, ist es nicht überraschend, dass sie unterschiedlich auf ED oder andere Umwelteinflüsse reagieren. Die Mechanismen, wie es zu Unterschieden zwischen den Geschlechtern kommt, sind jedoch immer noch Gegenstand aktueller Forschung. Ursprünglich müssen alle Unterschiede auf den Geschlechtschromosomen basieren, da diese der einzige Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Zygoten sind. Mit der Identifikation des *Sex Determining Region of Y* (SRY)-Gen hatte man 1990 diesen Faktor gefunden (SINCLAIR et al. 1990). SRY induziert in Männchen die Bildung der Hoden, welche wiederum durch ihre Testosteronsekretion zur Vermännlichung des Körpers führen. Während man lange Zeit davon ausging, dass alle Geschlechtsunterschiede auf den Geschlechtshormonen beruhen, hat man in den letzten Jahren herausgefunden, dass neben dem SRY-Gen noch weitere geschlechtsspezifische Gene eine Rolle spielen. So gibt es Studien in Mäusen, die das sogenannte *Four Core Genotypes* (FCG)-Modell verwenden, in dem das SRY-Gen auf ein Autosom verschoben wurde. Damit wurde das Geschlecht unabhängig von den X- und Y-Chromosomen, es gab also vier verschiedene Geschlechter: XX-Weibchen, XY-Weibchen, XX-Männchen und XY-Männchen (MAJDIC und TOBET 2011). Während sich in weiten Teilen die Bedeutung des SRY-Gens bestätigte, so gab es auch Merkmale, die nicht durch SRY, sondern durch andere Gene auf den X- und Y-Chromosomen bestimmt wurden. Beispiele dafür sind aggressives Verhalten, Schmerzempfindung, Alkoholsucht und Genexpression (MCCARTHY und ARNOLD 2011). Dies passt zu anderen Experimenten, in denen gezeigt wurde, dass es in männlichen und weiblichen Gehirnen von Mäusen bereits vor der Bildung der Gonaden differenziell exprimierte Gene gibt (DEWING et al. 2003). In einer anderen Studie wurde gefunden, dass die Expression von einem Drittel aller Gene in bovinen Blastozysten vom Geschlecht abhängt (BERMEJO-ALVAREZ et al. 2010).

Für die Entwicklung des Gehirns spielen Hormone eine wichtige Rolle. Östrogene im Gehirn eines Fetus stammen entweder von der Mutter, den fetalen Nebennieren und Gonaden, oder sie werden im Gehirn aus Testosteron synthetisiert. Die Expression von Östrogenrezeptoren sowie der P-450-Aromatase, welche Estradiol synthetisiert, sind während der Fetalentwicklung und kurz nach der Geburt am höchsten und nehmen mit zunehmendem Alter ab (MCCARTHY 2008). Estradiol reguliert unter anderem die Synaptogenese und die Apoptose im Gehirn, wobei sie beides in einigen Regionen verstärkt und in anderen verhindert. Dies ist einer der Gründe, weshalb sich die Gehirne von Männchen und Weibchen unterschiedlich entwickeln, z. B. bezüglich der Größe einzelner Gehirnregionen. In Bezug auf das Verhalten führt Estradiol zu einer Maskulinisierung und einer Defeminisierung (MCCARTHY und ARNOLD 2011). Wie dies im Detail geschieht, wurde noch nicht geklärt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass Östradiol in Männchen und Weibchen zur gleichen Zeit am gleichen Ort im Gehirn wirkt (BAKKER und BROCK 2010). Aufgrund dieser Komplexität ist es schwierig vor-

auszusagen, was für eine Wirkung ein ED auf das Gehirn hat. Jedoch ist es nicht überraschend, dass ED auf das Verhalten von Männchen und Weibchen teils gegenteilige Wirkungen haben.

In Menschen entwickeln sich männliche Feten von Beginn der Schwangerschaft an schneller als weibliche (LUBCHENCO et al. 1963, ERIKSSON et al. 2010). In Mäusen und Rindern wurde gezeigt, dass sich XY-Blastozysten schneller teilen als XX-Blastozysten (MITTWOCH 1993). In diesem Stadium gibt es bereits starke geschlechtsspezifische Expressionsunterschiede. Neben diesen Unterschieden im Embryo scheint auch das Geschlecht der Plazenta eine wichtige Rolle zu spielen. Obwohl es zu diesem Thema erst wenige Studien gibt, deuten verschiedene Resultate darauf hin, dass das Geschlecht der Plazenta einen Einfluss darauf hat, wie diese auf Umwelteinflüsse wie die maternale Ernährung, Stress oder ED reagiert. In Mäusen wurde gezeigt, dass XY-Plazenten signifikant größer sind als XX-Plazenten, wobei dieser Effekt unabhängig vom Geschlecht der Gonaden war (ISHIKAWA et al. 2003). Eine mögliche Erklärung ist die geschlechtsspezifische Genexpression, welche für die Plazenta gezeigt wurde (GABORY et al. 2013). In Mäusen hat man gefunden, dass Stress während der Schwangerschaft einen sexspezifischen Effekt auf die plazentale Genexpression hat, wodurch der Transport von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen reguliert wird (GOEL und BALE 2009). Ebenso wurde gefunden, dass die maternale Ernährung auf die Genexpression in weiblichen Plazenten einen viel stärkeren Einfluss hat als auf die von männlichen Plazenten (GABORY et al. 2012).

4.1 Gehirn und Verhalten

Eine Vielzahl an Studien hat negative Effekte von *In-utero*-Exposition von ED auf die Entwicklung des Gehirnes festgestellt, wobei Bisphenol A der am meisten untersuchte ED ist (KUNDAKOVIC und CHAMPAGNE 2011). Viele dieser Studien finden Effekte bei BPA-Konzentrationen, die deutlich unter dem NOAEL (*no observable adverse effect level* = 50 mg/kg/Tag) von BPA liegen, zum Teil sogar unterhalb des ADI (*acceptable daily intake* = 50 µg/kg/Tag) (GEENS et al. 2012). Interessanterweise hat BPA oftmals unterschiedliche Auswirkungen auf männliche und weibliche Nachkommen, wobei die geschlechtsspezifischen Unterschiede meist verringert oder umgekehrt werden. Wir werden zuerst auf einige Studien an Ratten und Mäusen eingehen und anschließend die epidemiologische Literatur beim Menschen besprechen.

KUBO et al. haben ICR/Jcl-Mäusen während der Schwangerschaft verschiedene Dosen von BPA über das Trinkwasser verabreicht (30, 300 und 1500 µg/kg/Tag) (KUBO et al. 2001, 2003). Dabei haben sie bei allen Konzentrationen festgestellt, dass sich der *Locus caeruleus* (LC) in Männchen vergrößerte, während er sich in Weibchen verkleinerte. Dadurch war der LC in den behandelten Tieren bei den Männchen größer, während er in der Kontrollgruppe bei den Weibchen größer war. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede in einem anderen Bereich des Gehirns (SDN-POA) blieben jedoch erhalten. BPA hatte ebenfalls Auswirkungen auf das Verhalten der Tiere. So zeigten die BPA-behandelten Tiere im Gegensatz zur Kontrollgruppe keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Exploration im *Open-Field*-Test. Keine Auswirkungen wurden hingegen auf die sexuelle Entwicklung bzw. das Verhalten gefunden.

In einer ähnlichen Studie haben RUBIN et al. CD-1-Mäusen sehr geringe Dosen (25 und 250 ng/kg/Tag) von BPA während der Schwangerschaft und Laktation subkutan verabreicht (RUBIN et al. 2006). Dies führte zu einer Verringerung der geschlechtsspezifischen Unter-

schiede in der Anzahl an Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Neuronen sowie dem Verhalten im *Open-Field-Test*.

KUNDAKOVIC et al. zeigen ebenfalls eine Umkehrung des geschlechtsspezifischen Verhaltens nach Gabe von BPA in BALB/c-Mäusen (KUNDAKOVIC et al. 2013). In dieser Studie wurde auch die Genexpression von Östrogenrezeptoren (ER α , ER β und ERR γ) im Gehirn untersucht (Präfrontaler Cortex und Hypothalamus). Es zeigte sich, dass BPA zu starken Expressionsveränderungen führte, die in Männchen und Weibchen jeweils entgegengesetzt waren. Auch die Dosis an BPA hatte einen großen Effekt, wobei insbesondere im Hypothalamus nicht monotone Veränderungen gefunden wurden. Während 2 und 20 $\mu\text{g/kg/Tag}$ einen Effekt zeigten, war dieser bei 200 $\mu\text{g/kg/Tag}$ wieder aufgehoben. Die Veränderungen der ER-Expression korrelierten mit der Expression der DNA-Methyltransferasen (DNMT) 1 und 3A sowie mit der Methylierung des ESR1-Gens. Dies deutet darauf hin, dass BPA über Veränderungen der DNA-Methylierung lang anhaltende Effekte im Gehirn produzieren kann. Verschiedene andere Studien bestätigen, dass ED geschlechtsspezifische Effekte auf die Organisation des Gehirns (TANDO et al. 2007, PATISAUL et al. 2006), die Östrogenrezeptor-Expression (CAO et al. 2012, CAO 2013) und das Verhalten haben (DESSI-FULGHERI et al. 2002, FUNABASHI et al. 2004).

Lassen sich die Resultate der Studien in Ratten und Mäusen auf Menschen übertragen? Dies ist naturgemäss schwierig zu beantworten, es gibt jedoch einige Hinweise für ähnliche Effekte beim Menschen. So gibt es beispielsweise Studien, welche den Zusammenhang zwischen der BPA-Konzentration von schwangeren Frauen und dem geschlechtsspezifischen Verhalten ihrer Kinder untersuchen. BRAUN et al. haben in einer Kohorte von 244 Frauen und ihren Kindern die BPA-Exposition mittels Urinproben analysiert (BRAUN et al. 2011, 2009). Im Alter von 2 und 3 Jahren wurde das Verhalten der Kinder mittels standardisierter Tests gemessen. Dabei zeigte sich, dass erhöhte BPA-Konzentrationen während der Schwangerschaft mit einem höheren Level an Ängstlichkeit, Hyperaktivität, emotionaler Kontrolle und Verhaltenshemmung assoziiert war. Dieser Effekt war bei Mädchen deutlich stärker zu sehen als bei Knaben. Ebenfalls zeigten die BPA-Konzentrationen der Kinder wenig Einfluss auf das Verhalten, was die Wichtigkeit der Schwangerschaft auf die Prägung unterstreicht. Eine ähnliche Studie mit jedoch gegenteiligen Resultaten zeigte, dass erhöhte BPA-Konzentrationen bei Jungen positiv mit emotional reaktivem und aggressivem Verhalten korrelierte, während bei Mädchen eine negative Korrelation mit aggressivem Verhalten und Ängstlichkeit festgestellt wurde (PERERA et al. 2012). Möglicherweise liegt der Grund für die unterschiedlichen Resultate der beiden Studien an der Ethnizität bzw. dem sozialen Status der beteiligten Familien. Es werden somit noch weitere Studien benötigt, um zu zeigen, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen BPA-Exposition und dem Verhalten von Kindern besteht.

Weitere Studien haben den Einfluss von Polychlorierten Biphenylen (PCB), langlebigen organischen Schadstoffen (POPs, *persistent organic pollutants*), Phtalaten und Dioxin auf das Spielverhalten von Kindern untersucht. Wie bei den vorhergehenden Studien wurden dafür während der Schwangerschaft genommene Proben (Urin, Blut oder Muttermilch) verwendet, sowie standardisierte Fragebögen, mit denen die Mütter das Verhalten ihrer Kinder beurteilten. VREUGDENHIL et al. fanden, dass höhere pränatale PCB-Konzentrationen in Jungen mit weniger maskulinem Spielen, in Mädchen mit mehr maskulinem Spielen assoziiert waren (VREUGDENHIL et al. 2002). Erhöhte Dioxin-Konzentrationen waren hingegen sowohl bei Mädchen wie Jungen mit femininerem Spielen verbunden. WINNEKE et al. kamen in einer anderen Studie

zu ähnlichen, wenn auch nicht identischen Ergebnissen (WINNEKE et al. 2013). So fanden sie, dass Dioxin- und PCB-Exposition in Jungen mit femininerem, in Mädchen mit weniger femininem Verhalten assoziiert war. Die Resultate im maskulinen Verhalten waren ähnlich wie bei VREUGDENHIL et al., jedoch statistisch nicht signifikant. SWAN et al. zeigten, dass die pränatale Exposition mit verschiedenen Phthalataten bei Jungen mit weniger maskulinem Spielen korrelierte (SWAN et al. 2010). Bei Mädchen wurde hingegen kein Unterschied festgestellt. Tierische Studien zeigen, dass Phthalatate während der sexuellen Differenzierung des Fetus die Synthese von Testosteron in den Leydig-Zellen inhibieren und damit die fetale Testosteronkonzentration verringern (WELSH et al. 2008).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es verschiedene Hinweise bezüglich des Einflusses von ED auf das Verhalten von Kindern gibt. Ähnliche Effekte wurden auch in Tierstudien gezeigt (KUNDAKOVIC und CHAMPAGNE 2011). Humane Studien liegen jedoch noch sehr limitiert (besonders in der Anzahl der untersuchten Kinder) und teilweise widersprüchlich vor.

4.2 Kardiovaskuläres System

Gemäß der von BARKER postulierten DOHaD (*Developmental origins of health and disease*)-Theorie liegt die Ursache von gewissen im Erwachsenenalter auftretenden Krankheiten in einer gestörten Fetalentwicklung (BARKER 2004). Die Grundlage für diese Theorie ist die Korrelation von geringem Geburtsgewicht und dem späteren Auftreten einer Vielzahl an Krankheiten, beispielsweise von Bluthochdruck, koronaren Herzkrankheiten, Übergewicht, Diabetes und Schlaganfällen. Von vielen dieser Krankheiten sind deutlich mehr Männer als Frauen betroffen. Studien zeigen, dass die Ursache dafür wohl nicht nur auf unterschiedlichen Lebensstilen beruht, sondern dass es auch biologische Faktoren gibt, die bereits während der Fetalentwicklung einsetzen (GRIGORE et al. 2008). So führte beispielsweise maternale Mangelernährung während der Präimplantationsperiode bei männlichen Ratten zu Bluthochdruck, nicht aber bei weiblichen (KWONG et al. 2000). Andere Studien zeigen, dass bei Schafen nach einer pränatalen Exposition mit Dexamethason, einem künstlichen Glucocorticoid, die männlichen Nachkommen viel stärker von Bluthochdruck betroffen sind als die weiblichen (DODIC et al. 2002, 1998).

Von zentraler Bedeutung für die Entstehung von Bluthochdruck ist die Niere durch ihre Funktionen im Natriumhaushalt und der Regulation des intravaskulären Flüssigkeitsvolumens (GUYTON et al. 1972). In Tierstudien wurde ein Zusammenhang zwischen geringem Geburtsgewicht und einer verringerten Anzahl an Nephronen (funktionelle Untereinheiten der Niere) gefunden, was über eine verringerte Natriumausscheidung zu Bluthochdruck führen könnte (BRENNER et al. 1988).

Die abweichende Häufigkeit von Bluthochdruck bei Männern und Frauen beruht möglicherweise auf den unterschiedlichen Konzentrationen an Sexualhormonen. Während erhöhte Testosteronspiegel Bluthochdruck begünstigen, zeigen Östrogene eine schützende Wirkung. So werden beispielsweise männliche Tiere durch Kastration vor Bluthochdruck (als Folge einer maternalen Mangelernährung) geschützt (OJEDA et al. 2007), während in einem anderen Modell Ovariectomie weibliche Tieren hierfür anfälliger macht (HINOJOSA-LABORDE et al. 2004). Dies passt auch zu der Tatsache, dass Frauen nach der Menopause vermehrt unter Bluthochdruck leiden, wofür eine reduzierte Funktion der Ovarien verantwortlich sein könnte (SCHULMAN et al. 2006). Der genaue Mechanismus, mit dem Östrogene und Testosteron den Blutdruck verändern, ist nicht bekannt, es wird aber vermutet, dass dies über eine Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems geschieht (GRIGORE et al. 2008).

4.3 Wachstum, Gewichtsentwicklung und Körperzusammensetzung

Ein weiterer fundamentaler Unterschied zwischen Männchen und Weibchen in vielen Spezies, inklusive Mäusen, Ratten und Menschen, besteht in der Somatotropin (GH, *Growth hormone*)-Sekretion durch die Hypophyse. Dieses Proteohormon reguliert u. a. das Knochenwachstum, die Glukoseaufnahme, die Fettsäureoxidation sowie den Abbau von Steroiden und Medikamenten in der Leber. Während die Somatotropin-Sekretion in Weibchen relativ kontinuierlich ist, geschieht sie in Männchen in zyklischen Pulsen etwa alle 3,5 Stunden (GABORY et al. 2009). Dieses Muster wird während der neonatalen Entwicklung festgelegt. Als Folge davon gibt es erhebliche geschlechtsspezifische Unterschiede im Lebermetabolismus. Die zyklischen Somatotropin-Pulse führen in Männchen zu einer Tyrosin-Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT5b (*signal transducer and activator of transcription 5b*) in der Leber, wodurch dieser aktiviert wird und die geschlechtsspezifische Genexpression, z. B. von Cytochrom-P450 (CYP)-Enzymen, reguliert. Bei verschiedenen männlich exprimierten Genen ist der Promotor an bestimmten CpGs in Männchen demethyliert, nicht aber in Weibchen. Es ist denkbar, dass diese Methylierungsmuster durch ED verändert werden, wobei man geschlechtsspezifische Effekte erwarten würde (GABORY et al. 2009).

Als „Obesogens“ werden chemische Substanzen bezeichnet, denen man zu einem frühen Entwicklungsstadium oder sein Leben lang ausgesetzt war, die den Fettstoffwechsel beeinträchtigen und dadurch das Risiko für Übergewicht erhöhen (GRUN und BLUMBERG 2006). Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass hierzu auch verschiedene ED gehören, welche das Körpergewicht, die Adipozytenentwicklung und somit die Bildung von Fettgewebe beeinflussen. In Tierstudien wurde nachgewiesen, dass eine prä- und postnatale Exposition zu einem veränderten Wachstum und einer erhöhten Fettleibigkeit im Erwachsenenalter führen kann (HEINDEL und VOM SAAL 2009, JANESICK und BLUMBERG 2011, NEWBOLD et al. 2009). Für niedrige Dosen an BPA zeigen Studien an Nagetieren, dass es zu einem verstärkten postnatalen Wachstum und Fettleibigkeit kommt (HEINDEL und VOM SAAL 2009). Ein Beispiel ist die Studie von MIYAWAKI und Kollegen (MIYAWAKI et al. 2007). Sie fanden heraus, dass die kontinuierliche Gabe an BPA bei männlichen und weiblichen Nachkommen sowohl das Körpergewicht wie auch das Gewicht des Fettgewebes erhöhte. Interessanterweise konnten hier zum Teil auch nichtmonotone Wirkungsweisen beobachtet werden, da in den weiblichen Nachkommen der Effekt auf die Fettgewebemenge und die Leptinkonzentration im Serum am stärksten in der niedrigen BPA-Dosis auftrat (MIYAWAKI et al. 2007). Studien mit DES zeigen deutliche geschlechtsspezifische und dosisabhängige Wirkungen. So kam es bei den weiblichen Mäusen nach einer *In-utero*-Behandlung mit DES zu einem erhöhten Körpergewicht und erhöhtem Fettanteil als Adulte. Bei den männlichen Tieren hingegen wurde ein verringertes Körpergewicht festgestellt (NEWBOLD et al. 2009). Insgesamt zeigt sich, dass die Effekte von ED auf Körpergewicht und Fettleibigkeit substanzspezifisch sind, aber auch von der Dosis und dem Zeitpunkt der Exposition abhängen.

In einer eigenen Studie an Schweinen wurde der Einfluss verschiedener Dosierungen von E2 auch auf die Gewichtsentwicklung und die Körperzusammensetzung bestimmt (FURST et al. 2012). Hintergrund dieser Studie ist, dass auch natürliche Substanzen wie E2, die endogen vorkommende wirksamste östrogene Substanz, als ED wirken können. E2 eignet sich als östrogene Modellsubstanz, denn das Wirkspektrum ist sehr gut beschrieben. Um die Frage nach Effekten von geringen Konzentrationen zu untersuchen, wurden zwei niedrige Dosierungen verwendet. Einerseits eine Dosis nahe des für den Menschen bestimmten NOEL

(10 µg/kg KG/Tag) und andererseits die Menge des aus dem NOEL errechneten ADI (0,05 µg/kg KG/Tag) (JECFA 1999). Zudem wurde an eine weitere Gruppe von Tieren eine vergleichsweise hohe Dosis (1000 µg/kg KG/Tag) verabreicht. Die Kontrollgruppe bekam nur das Trägerlösungsmittel – Ethanol – gefüttert. Als Zeitfenster der Exposition wurde die Trächtigkeit gewählt und das Schwein als Modelltier, da im Gegensatz zu Nagetieren Schweine und Menschen eine plazentäre Östrogensynthese besitzen (FURST et al. 2012). Dies ist wichtig, da die Menge an endogen vorkommenden Östrogenen einen Einfluss auf die Dosiswirkungsbeziehung und somit auf die Effekte von ED haben kann (VANDENBERG et al. 2012). Somit wäre es auch möglich, dass der Mensch aufgrund höherer Östrogenmengen während der Schwangerschaft weniger sensitiv gegenüber exogenen Östrogenen als Nagetiere ist (WITORSCH 2002). In unserer eigenen Studie wurden Sauen über die gesamte Dauer der Trächtigkeit täglich mit E2 gefüttert und die weiblichen und männlichen Nachkommen hinsichtlich vieler Merkmale untersucht. Ein interessanter Befund war, dass E2 keine Auswirkungen auf das HOXA10-Gen, und zwar weder auf die Expression noch auf die Methylierung, im Uterus bei den weiblichen Nachkommen hatte, obwohl solche Effekte in der Literatur bei Nagetieren mehrfach beschrieben wurden (PISTEK et al. 2013). Dennoch wurden Veränderungen sogar in der NOEL-Dosis auf die Nachkommen gefunden, wie die Untersuchungen von FÜRST und Kollegen (FURST et al. 2012) gezeigt haben. Zum Zeitpunkt der Geburt war das Körpergewicht noch unverändert, danach jedoch zeigte sich bei den männlichen Ferkeln in der höchsten Behandlungsgruppe eine geringere Gewichtszunahme bis zum Zeitpunkt des Absetzens und bei den weiblichen Tieren der ADI-Dosis ein geringeres Körpergewicht. Zum Schlachtzeitpunkt waren diese Unterschiede nicht mehr vorhanden, auch wenn die männlichen Tiere der höchsten Dosis noch einen Trend zu einem geringeren Körpergewicht aufwiesen. Bezüglich der Körperzusammensetzung wurden keine Veränderungen bei den weiblichen Ferkeln gefunden, jedoch wiesen die männlichen Tiere einen höheren prozentualen Fettanteil auf, wenn sie *in utero* mit der NOEL oder der hohen Dosis behandelt wurden. Somit konnten Effekte sogar der niedrigen Dosen an E2 auf die Nachkommen gezeigt werden. Bezüglich der hormonellen Situation in den Nachkommen, fanden sich im Blutplasma keine Unterschiede in der Konzentration an E2 und Testosteron, weder bei den Männchen noch bei den Weibchen. Deshalb ist anzunehmen, dass eine durch Östrogene vermittelte epigenetische Programmierung der mesenchymalen Stammzellen (MSC) während der Fetalentwicklung stattgefunden haben könnte (FURST et al. 2012). Dabei könnten Östrogene eine vermehrte Entwicklung in Richtung der Präadipozyten statt Knochen- bzw. Muskelregenerierung stimuliert haben (JANESICK und BLUMBERG 2011). Dies wurde für den Effekt von Tributylzinn und Rosaglitazon auf MSC aus weißem Fettgewebe bereits gezeigt (KIRCHNER et al. 2010). Da die Regulation der Adipozyten in männlichen Nachkommen über Testosteron und den Androgenrezeptor (AR), in weiblichen Nachkommen indes über Östrogene und die Östrogenrezeptoren vorgenommen wird (BJORNTORP 1997), erscheint eine geschlechtsspezifische Ausprägung erklärbar. Über eine mögliche Reduktion des AR während der Östrogenexposition (CARDONE et al. 1998) *in utero* könnte es zu einer veränderten Adipogenese in den männlichen Nachkommen geführt haben (FURST et al. 2012).

Als alternativer Mechanismus wird in den eigenen Studien derzeit überprüft, inwieweit das sensitive Fenster der Exposition bereits während der perikonzeptionellen Periode für die Wirkung von Östrogenen vorgelegen hat. Umfassende Charakterisierungen der *in utero* exponierten Embryonen und des uterinen Milieus sollen Aufschluss darüber geben, ob während der Phase der niedrigsten endogen vorhandenen Östrogene, die während der frühen Trächtigkeit vorliegt, die exogene Östrogenexposition im Uterus zu Veränderungen des den Embryo

umgebenden Milieus geführt hat. Damit könnte der beobachtete Phänotyp durch eine direkte Wirkung des Östrogens am Embryo oder über die Beeinflussung des umgebenden Milieus (des Histotrophen) zu einer adversen Konstellation geführt haben. Inwieweit die Veränderungen geschlechtsspezifisch aufgetreten sind, wird derzeit untersucht.

4.4 Knochen

Osteoporose durch im Alter auftretenden Verlust an Knochensubstanz stellt eine große ökonomische Belastung dar und kommt häufiger bei Frauen als bei Männern vor. Dies ist durch die unterschiedlichen Veränderungen der Hormonmengen im Körper bedingt, aber auch durch generelle Unterschiede in Bezug auf die Knochen (RIGGS et al. 2002). Die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Knochenmasse bilden sich vor allem in der Pubertät heraus. Dies führt dazu, dass Männer größere und stärkere Knochen bekommen als Frauen. Nach der Geburt wird das Knochenwachstum primär durch GH (*Growth hormone*) und IGF1 (*Insulin-like growth factor 1*) gesteuert. Mit der Pubertät kommen die Sexualsteroiden als weitere wichtige Faktoren hinzu (CALLEWAERT et al. 2010). Studien deuten darauf hin, dass das Osteoporoserisiko abhängig von der im frühen Erwachsenenalter erreichten Knochenmasse („peak bone mass“) ist, weshalb es wichtig ist, die geschlechtsspezifische Knochenentwicklung zu verstehen. Beim Mann ist Testosteron sehr wichtig, aber auch Östrogene sind beteiligt, wohingegen bei Frauen Östrogene entscheidend sind (SINGH et al. 2010). Am besten untersucht sind die Mechanismen bei Mäusen, wo bei männlichen Tieren sowohl das Wachstum der trabekulären wie auch der kortikalen Knochenmasse über Testosteron und den Androgenrezeptor gesteuert wird. Nach der Aromatisierung von Testosteron zu E2 wirkt dieses auch entscheidend an der kortikalen Knochenentwicklung über den ESR1 mit. In weiblichen Mäusen wird sowohl das Wachstum der trabekulären wie auch der kortikalen Knochenbereiche über E2 mittels der Östrogenrezeptoren moduliert (CALLEWAERT et al. 2010).

Viele Studien, überwiegend an Nagetieren, haben gezeigt, dass bereits prä- und postnatale Exposition mit ED das Knochenwachstum beeinflussen kann. Deutlich zeigen sich substanzspezifische Effekte. Daneben finden sich zudem geschlechtsspezifische Unterschiede, Wirkungen abhängig von dem untersuchten Knochen und der Knochenregion, und manchmal auch nicht monotone Dosiswirkungsbeziehungen. Studien mit BPA zeigen nur wenige signifikante Veränderungen, wohingegen DES zu unterschiedlichen Ergebnissen führte, wie zum Teil zu einer erhöhten Knochendichte in weiblichen Tieren (AGAS et al. 2013). MIGLIACCIO und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass sowohl niedrige als auch hohe Mengen an DES, *in utero* verabreicht, langfristig die Knochenmasse und die Menge an Kalzium in den Knochen der weiblichen Mäusen erhöhten (MIGLIACCIO et al. 1996). Eine andere Studie hingegen fand bei einer niedrigen Dosis an DES, welche ab dem 11. Tag der Trächtigkeit bis Tag 12 nach der Geburt gegeben wurde, dass der Bruchwiderstand des Knochens in den männlichen und weiblichen Nachkommen verringert war (PELCH et al. 2012). Insgesamt zeigten sich durch DES bei den männlichen Tieren seltener positive Auswirkungen auf die verschiedenen Knochenparameter (AGAS et al. 2013). Die Analyse von weiblichen Feten ergab, dass die Behandlung während der Trächtigkeit bereits *in utero* zu einer erhöhten Kalzifizierung des Skeletts führte. In den erwachsenen weiblichen Nachkommen fanden sich neben der erhöhten Knochenmasse auch Unterschiede im Knochenstoffwechsel, was auf epigenetische Veränderungen durch die Exposition *in utero* hinweist (MIGLIACCIO et al. 1996). Ein weiterer denkbarer Mechanismus beruht auf langfristigen Veränderungen des endokrinen Systems

(KALUDJEROVIC und WARD 2008). Studien an weiblichen Ratten, welche ihr Leben lang, beginnend in der Trächtigkeit, entweder sojahaltige bzw. isoflavonreiche Nahrung oder ein Futter ohne diese Substanzen bekommen haben, zeigen, dass das östrogenreiche Futter die Knochenentwicklung fördert, jedoch zeitweise dann keine Unterschiede mehr zu sehen sind; diese werden nach der Pubertät bzw. zu Beginn der Menopause wieder sichtbar (HERTRAMPF et al. 2009, WUTTKE et al. 2008). Dies zeigt, wie wichtig auch der Zeitpunkt der Analyse ist.

Es gibt nur sehr wenige Studien an Großtieren oder Primaten, jedoch zeigen auch diese, dass ein früher Kontakt mit ED sich langfristig auf verschiedene Knochenparameter auswirken kann (HERMSEN et al. 2008, LUNDBERG et al. 2006). Die Analysen von CSAKVARY und Mitarbeitern deuten zudem darauf hin, dass auch bei Kindern sich die E2-Konzentrationen im Blut bereits präpubertär auf den Knochen auswirken, da sie mit der Knochendichte und dem Mineralstoffgehalt sowie mit Markern des Knochenstoffwechsels korrelieren (CSAKVARY et al. 2013).

In der oben bereits erwähnten eigenen Studie an Schweinen (FURST et al. 2012), wurden neben der Körperzusammensetzung und der Gewichtsentwicklung auch verschiedene Knochenparameter bestimmt. Die Analysen (FLÖTER et al. 2016) zeigen, dass in den präpubertären Nachkommen sowohl in den niedrigen wie auch in der hohen Dosierung nur wenige Knochenparameter beeinflusst wurden. Dennoch fand sich z. B. in den männlichen Ferkeln hinsichtlich der Knochenstabilität in der Gruppe mit der ADI-Dosis eine signifikante Reduktion.

5. Ausblick

Die unterschiedlichen beobachteten Effekte, die eine maternale Exposition gegenüber ED auf die Entwicklung der Nachkommen zeigen, treten in Form von nicht-monotonen Dosiswirkungsbeziehungen auf und zeigen eine große Heterogenität bei der Ausprägung, die zum Teil oft geschlechtsspezifisch beobachtet werden kann. Die Heterogenität der Beobachtungen lässt derzeit keine klare Vorhersage auf eine generelle Wirkung von pränataler ED-Exposition auf die Nachkommen zu. Die wichtigste Erklärung hierfür ist vermutlich, dass die Effekte stark mit dem Expositionsweg und der Methode der Applikation, dem Zeitfenster der Exposition, der endokrinen Konstellation der betroffenen Spezies und den unterschiedlichen Wirkungsspektren der verschiedenen Substanzen sowie deren applizierter Dosen zusammenhängen. Daher sind sowohl longitudinale epidemiologische Studien als auch die Verwendung einer Vielzahl von Modellorganismen zur grundlegenden Klärung der mechanistischen Zusammenhänge zwischen maternaler Exposition gegenüber ED und der Beeinflussung der postnatalen Entwicklung notwendig.

Literatur

- AGAS, D., SABBieti, M. G., and MARCHETTI, L.: Endocrine disruptors and bone metabolism. *Archives of Toxicology* 87, 735–751 (2013)
- AVISSAR-WHITING, M., VEIGA, K. R., UHL, K. M., MACCANI, M. A., GAGNE, L. A., MOEN, E. L., and MARSIT, C. J.: Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reprod. Toxicol.* 29/4, 401–406 (2010)
- BARKER, D. J.: Developmental origins of adult health and disease. *J. Epidemiol. Commun. Health* 58, 114–115 (2004)
- BAKKER, J., and BROCK, O.: Early oestrogens in shaping reproductive networks: evidence for a potential organisational role of oestradiol in female brain development. *J. Neuroendocrinol.* 22, 728–735 (2010)

- BERMEJO-ALVAREZ, P., RIZOS, D., RATH, D., LONERGAN, P., and GUTIERREZ-ADAN, A.: Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 3394–3399 (2010)
- BJÖRNTORP, P.: Hormonal control of regional fat distribution. *Hum. Reprod.* *12*, Suppl. 1, 21–25 (1997)
- BRAUN, J. M., KALKBRENNER, A. E., CALAFAT, A. M., YOLTON, K., YE, X., DIETRICH, K. N., and LANPHEAR, B. P.: Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics* *128*, 873–882 (2011)
- BRAUN, J. M., YOLTON, K., DIETRICH, K. N., HORNING, R., YE, X., CALAFAT, A. M., and LANPHEAR, B. P.: Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environmental Health Perspectives* *117*, 1945–1952 (2009)
- BRENNER, B. M., GARCIA, D. L., and ANDERSON, S.: Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Amer. J. Hypertens.* *1*, 335–347 (1988)
- CALLEWAERT, F., SINNESAELE, M., GIELEN, E., BOONEN, S., and VANDERSCHUEREN, D.: Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *J. Endocrinol.* *207*, 127–134 (2010)
- CAO, J., MICKENS, J. A., MCCAFFREY, K. A., LEYER, S. M., and PATISAUL, H. B.: Neonatal bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus. *Neurotoxicology* *33*, 23–36 (2012)
- CAO, J., REBULI, M. E., ROGERS, J., TODD, K. L., LEYER, S. M., FERGUSON, S. A., and PATISAUL, H. B.: Prenatal bisphenol A exposure alters sex-specific estrogen receptor expression in the neonatal rat hypothalamus and amygdala. *Toxicol. Sci.* *133/1*, 157–173 (2013)
- CARDONE, A., ANGELINI, F., and VARRIALE, B.: Autoregulation of estrogen and androgen receptor mRNAs and down-regulation of androgen receptor mRNA by estrogen in primary cultures of lizard testis cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* *110/3*, 227–236 (1998)
- CSAKVARY, V., PUSKAS, T., OROSZLAN, G., LAKATOS, P., KALMAN, B., KOVACS, G. L., and TOLDY, E.: Hormonal and biochemical parameters correlated with bone densitometric markers in prepubertal Hungarian children. *Bone* *54*, 106–112 (2013)
- DESSI-FULGHERI, F., PORRINI, S., and FARABOLLINI, F.: Effects of perinatal exposure to bisphenol A on play behavior of female and male juvenile rats. *Environmental Health Perspectives* *110*, Suppl. 3, 403–407 (2002)
- DEWING, P., SHI, T., HORVATH, S., and VILAIN, E.: Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Brain research. Mol. Brain Res.* *118*, 82–90 (2003)
- DODIC, M., ABOUANTOUN, T., O'CONNOR, A., WINTOUR, E. M., and MORITZ, K. M.: Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep. *Hypertension* *40*, 729–734 (2002)
- DODIC, M., MAY, C. N., WINTOUR, E. M., and COGHLAN, J. P.: An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin. Sci.* *94*, 149–155 (1998)
- ERIKSSON, J. G., KAJANTIE, E., OSMOND, C., THORNBURG, K., and BARKER, D. J.: Boys live dangerously in the womb. *Amer. J. Hum. Biol.* *22/3*, 330–335 (2010)
- FLÖTER, V. L., GALATEANU, G., FÜRST, R. W., SEIDLOVÁ-WUTTKE, D., WUTTKE, W., MÖSTL, E., HILDEBRANDT, T. B., and ULBRICH, S. E.: Sex-specific effects of low-dose gestational estradiol-17 β exposure on bone development in porcine offspring. *Toxicology* *366/367*, 60–67 (2016)
- FUNABASHI, T., KAWAGUCHI, M., FURUTA, M., FUKUSHIMA, A., and KIMURA, F.: Exposure to bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Psychoneuroendocrinology* *29*, 475–485 (2004)
- FÜRST, R. W., PISTEK, V. L., KLIEM, H., SKURK, T., HAUNER, H., MEYER, H. H., and ULBRICH, S. E.: Maternal low-dose estradiol-17beta exposure during pregnancy impairs postnatal progeny weight development and body composition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *263*, 338–344 (2012)
- GABORY, A., ATTIG, L., and JUNIEN, C.: Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol. Cell. Endocrinol.* *304/1–2*, 8–18 (2009)
- GABORY, A., FERRY, L., FAJARDY, I., JOUANEU, L., GOTHÉ, J. D., VIGÉ, A., FLEUR, C., MAYEUR, S., GALLOU-KABANI, C., GROSS, M. S., ATTIG, L., VAMBERGUE, A., LESAGE, J., REUSENS, B., VIEAU, D., REMACLE, C., JAIS, J. P., and JUNIEN, C.: Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PLOS ONE* *7/11*, e47986 (2012)
- GABORY, A., ROSEBOOM, T. J., MOORE, T., MOORE, L. G., and JUNIEN, C.: Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biol. Sex Differ.* *4/1*, 5 (2013)
- GEENS, T., AERTS, D., BERTHOT, C., BOURGUIGNON, J. P., GOEYENS, L., LECOMTE, P., MAGHUIIN-ROGISTER, G., PIRONNET, A. M., PUSSEMIER, L., SCIPPO, M. L., VAN LOCO, J., and COVACI, A.: A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem. Toxicol.* (an international journal published for the Brit. Industr. Biol. Res. Assoc.) *50*, 3725–3740 (2012)
- GOEL, N., and BALE, T. L.: Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. *J. Neuroendocrinol.* *21/4*, 415–420 (2009)

- GRIGORE, D., OJEDA, N. B., and ALEXANDER, B. T.: Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gender Medicine* 5, Suppl. A, 121–132 (2008)
- GRUN, F., and BLUMBERG, B.: Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147, 50–55 (2006)
- GUYTON, A. C., COLEMAN, T. G., COWLEY, A. V. Jr., SCHEEL, K. W., MANNING, R. D. Jr., and NORMAN, R. A. Jr.: Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Amer. J. Med.* 52, 584–594 (1972)
- HEINDEL, J. J., and VOM SAAL, F. S.: Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 90–96 (2009)
- HERMSEN, S. A., LARSSON, S., ARIMA, A., MUNEOKA, A., IHARA, T., SUMIDA, H., FUKUSATO, T., KUBOTA, S., YASUDA, M., and LIND, P. M.: In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects bone tissue in rhesus monkeys. *Toxicology* 253, 147–152 (2008)
- HERTRAMPF, T., LEDWIG, C., KULLING, S., MOLZBERGER, A., MOLLER, F. J., ZIERAU, O., VOLLMER, G., MOORS, S., DEGEN, G. H., and DIEL, P.: Responses of estrogen sensitive tissues in female Wistar rats to pre- and postnatal isoflavone exposure. *Toxicol. Lett.* 191, 181–188 (2009)
- HINOJOSA-LABORDE, C., CRAIG, T., ZHENG, W., JI, H., HAYWOOD, J. R., and SANDBERG, K.: Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 44, 405–409 (2004)
- HOOVER, R. N., HYER, M., PFEIFFER, R. M., ADAM, E., BOND, B., CHEVILLE, A. L., COLTON, T., HARTGE, P., HATCH, E. E., HERBST, A. L., KARLAN, B. Y., KAUFMAN, R., NOLLER, K. L., PALMER, J. R., ROBBOY, S. J., SAAL, R. C., STROHSNITTER, W., TITUS-ERNSTOFF, L., and TROISI, R.: Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *New Engl. J. Med.* 365, 1304–1314 (2011)
- ISHIKAWA, H., RATTIGAN, A., FUNDELE, R., and BURGOYNE, P. S.: Effects of sex chromosome dosage on placental size in mice. *Biol. Reprod.* 69/2, 483–488 (2003)
- JANESICK, A., and BLUMBERG, B.: Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth defects research. Part C. Embryo Today Rev.* 93, 34–50 (2011)
- JECFA: Fifty-second Meeting Rome, 2–11 February 1999. Summary and Conclusions* (1999)
- KALUDJEROVIC, J., and WARD, W. E.: Diethylstilbestrol has gender-specific effects on weight gain and bone development in mice. *J. Toxicol. Environmental Health Part A* 71, 1032–1042 (2008)
- KIRCHNER, S., KIEU, T., CHOW, C., CASEY, S., and BLUMBERG, B.: Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 24/3, 526–539 (2010)
- KUBO, K., ARAI, O., OGATA, R., OMURA, M., HORI, T., and AOU, S.: Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 304, 73–76 (2001)
- KUBO, K., ARAI, O., OMURA, M., WATANABE, R., OGATA, R., and AOU, S.: Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci. Res.* 45, 345–356 (2003)
- KUNDAKOVIC, M., and CHAMPAGNE, F. A.: Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain Behavior Immunity* 25, 1084–1093 (2011)
- KUNDAKOVIC, M., GUDSNUK, K., FRANKS, B., MADRID, J., MILLER, R. L., PERERA, F. P., and CHAMPAGNE, F. A.: Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 9956–9961 (2013)
- KWONG, W. Y., WILD, A. E., ROBERTS, P., WILLIS, A. C., and FLEMING, T. P.: Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* 127, 4195–4202 (2000)
- LUBCHENCO, L., HANSMAN, C., DRESSLER, M., and BOYD, E.: Intrauterine growth as estimated from liveborn birth-weight data at 24 to 42 weeks of gestation. *Pediatrics* 32, 793–800 (1963)
- LUNDBERG, R., LYCHE, J. L., ROPSTAD, E., ALEKSANDERSEN, M., RONN, M., SKAARE, J. U., LARSSON, S., ORBERG, J., and LIND, P. M.: Perinatal exposure to PCB 153, but not PCB 126, alters bone tissue composition in female goat offspring. *Toxicology* 228, 33–40 (2006)
- MAJDIC, G., and TOBET, S.: Cooperation of sex chromosomal genes and endocrine influences for hypothalamic sexual differentiation. *Frontiers in Neuroendocrinology* 32, 137–145 (2011)
- MATTHEWS, J., and GUSTAFSSON, J. A.: Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling* 4, e016 (2006)
- MCCARTHY, M. M.: Estradiol and the developing brain. *Physiol. Rev.* 88, 91–124 (2008)
- MCCARTHY, M. M., and ARNOLD, A. P.: Reframing sexual differentiation of the brain. *Nature Neurosci.* 14, 677–683 (2011)
- MIGLIACCIO, S., NEWBOLD, R. R., BULLOCK, B. C., JEFFERSON, W. J., SUTTON, F. G. Jr., MCLACHLAN, J. A., and KORACH, K. S.: Alterations of maternal estrogen levels during gestation affect the skeleton of female offspring. *Endocrinology* 137, 2118–2125 (1996)

- MITTWOCH, U.: Blastocysts prepare for the race to be male. *Hum. Reprod.* 8/10, 1550–1555 (1993)
- MIYAWAKI, J., SAKAYAMA, K., KATO, H., YAMAMOTO, H., and MASUNO, H.: Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J. Atherosclerosis Thrombosis* 14, 245–252 (2007)
- MORANI, A., WARNER, M., and GUSTAFSSON, J. A.: Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J. Internal Med.* 264, 128–142 (2008)
- NEWBOLD, R. R., PADILLA-BANKS, E., and JEFFERSON, W. N.: Environmental estrogens and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304, 84–89 (2009)
- OJEDA, N. B., GRIGORE, D., YANES, L. L., ILIESCU, R., ROBERTSON, E. B., ZHANG, H., and ALEXANDER, B. T.: Testosterone contributes to marked elevations in mean arterial pressure in adult male intrauterine growth restricted offspring. *Amer. J. Physiol. Regulatory Integrative Comparative Physiol.* 292, R758–763 (2007)
- PARUTHIYIL, S., PARMAR, H., KEREKATTE, V., CUNHA, G. R., FIRESTONE, G. L., and LEITMAN, D. C.: Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res.* 64, 423–428 (2004)
- PATISAUL, H. B., FORTINO, A. E., and POLSTON, E. K.: Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 111–118 (2006)
- PELCH, K. E., CARLETON, S. M., PHILLIPS, C. L., and NAGEL, S. C.: Developmental exposure to xenoestrogens at low doses alters femur length and tensile strength in adult mice. *Biol. Reprod.* 86, 69 (2012)
- PERERA, F., VISHNEVETSKY, J., HERBSTMAN, J. B., CALAFAT, A. M., XIONG, W., RAUH, V., and WANG, S.: Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort. *Environmental Health Perspectives* 120, 1190–1194 (2012)
- PISTEK, V. L., FURST, R. W., KLIEM, H., BAUERSACHS, S., MEYER, H. H., and ULBRICH, S. E.: HOXA10 mRNA expression and promoter DNA methylation in female pig offspring after in utero estradiol-17beta exposure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138, 435–444 (2013)
- RIGGS, B. L., KHOSLA, S., and MELTON, L. J., 3rd: Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr. Rev.* 23, 279–302 (2002)
- ROSEBOOM, T. J., PAINTER, R. C., ROOIJ, S. R. DE, VAN ABELEN, A. F., VEENENDAAL, M. V., OSMOND, C., and BARKER, D. J.: Effects of famine on placental size and efficiency. *Placenta* 32/5, 395–399 (2011)
- RUBIN, B. S., LENKOWSKI, J. R., SCHAEBERLE, C. M., VANDENBERG, L. N., RONSHEIM, P. M., and SOTO, A. M.: Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147, 3681–3691 (2006)
- SCHULMAN, I. H., ARANDA, P., RAIJ, L., VERONESI, M., ARANDA, F. J., and MARTIN, R.: Surgical menopause increases salt sensitivity of blood pressure. *Hypertension* 47, 1168–1174 (2006)
- SINCLAIR, A. H., BERTA, P., PALMER, M. S., HAWKINS, J. R., GRIFFITHS, B. L., SMITH, M. J., FOSTER, J. W., FRISCHAUF, A. M., LOVELL-BADGE, R., and GOODFELLOW, P. N.: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346/6281, 240–244 (1990)
- SINGH, D., SANYAL, S., and CHATTOPADHYAY, N.: The role of estrogen in bone growth and formation: changes at puberty. *Cell Health Cytoskeleton* (2010)
- STROM, A., HARTMAN, J., FOSTER, J. S., KIETZ, S., WIMALASENA, J., and GUSTAFSSON, J. A.: Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1566–1571 (2004)
- SUSIARJO, M., SASSON, I., MESAROS, C., and BARTOLOMEI, M. S.: Bisphenol a exposure disrupts genomic imprinting in the mouse. *PLOS Genet.* 9/4, e1003401 (2013)
- SWAN, S. H., LIU, F., HINES, M., KRUSE, R. L., WANG, C., REDMON, J. B., SPARKS, A., and WEISS, B.: Prenatal phthalate exposure and reduced masculine play in boys. *Int. J. Androl.* 33, 259–269 (2010)
- TAKEDA, Y., LIU, X., SUMIYOSHI, M., MATSUSHIMA, A., SHIMOHIGASHI, M., and SHIMOHIGASHI, Y.: Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR{gamma} among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERRgamma isoform. *J. Biochem.* 146/1, 113–122 (2009)
- TANDO, S., ITOH, K., YAOI, T., IKEDA, J., FUJIWARA, Y., and FUSHIKI, S.: Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development. *Brain Development* 29, 352–356 (2007)
- VAN ABELEN, A. F., ROOIJ, S. R. DE, OSMOND, C., PAINTER, R. C., VEENENDAAL, M. V., BOSSUYT, P. M., ELIAS, S. G., GROBBEE, D. E., VAN DER SCHOUW, Y. T., BARKER, D. J., and ROSEBOOM, T. J.: The sex-specific effects of famine on the association between placental size and later hypertension. *Placenta* 32/9, 694–698 (2011)
- VANDENBERG, L. N., COLBORN, T., HAYES, T. B., HEINDEL, J. J., JACOBS, D. R. Jr., LEE, D. H., SHIODA, T., SOTO, A. M., VOM SAAL, F. S., WELSHONS, W. V., ZOELLER, R. T., and MYERS, J. P.: Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455 (2012)
- VANDENBERG, L. N., HAUSER, R., MARCUS, M., OLEA, N., and WELSHONS, W. V.: Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 24, 139–177 (2007)

- VREUGDENHIL, H. J., SLIJPER, F. M., MULDER, P. G., and WEISGLAS-KUPERUS, N.: Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in Dutch children at school age. *Environmental Health Perspectives* 110, A593–598 (2002)
- WELSH, M., SAUNDERS, P. T., FISKEN, M., SCOTT, H. M., HUTCHISON, G. R., SMITH, L. B., and SHARPE, R. M.: Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J. Clin. Invest.* 118, 1479–1490 (2008)
- WHO-UNEP (World Health Organization, United Nations Environment Programme): *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals*. (2012)
- WINNEKE, G., RANFT, U., WITTSIEPE, J., KASPER-SONNENBERG, M., FURST, P., KRAMER, U., SEITNER, G., and WILHELM, M.: Behavioral sexual dimorphism in school-age children and early developmental exposure to dioxins and PCBs: A follow-up study of the Duisburg cohort. *Environmental Health Perspectives* 122/3, 292–298 (2013)
- WITORSCH, R. J.: Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature. *Food Chem. Toxicol.* (an international journal published for the Brit. Industr. Biol. Res. Assoc.) 40, 905–912 (2002)
- WUTTKE, W., JARRY, H., BECKER, T., SCHULTENS, A., CHRISTOFFEL, V., GORKOW, C., and SEIDLOVA-WUTTKE, D.: Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 61, 159–170 (2008)
- ZALKO, D., JACQUES, C., DUPLAN, H., BRUEL, S., and PERDU, E.: Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82, 424–430 (2011)

Prof. Dr. Susanne E. ULBRICH
ETH Zurich
Animal Physiology
Institute of Agricultural Sciences
Universitätsstraße 2 / LFW B 58.1
8092 Zurich
Schweiz
Tel.: +41 44 6324806
E-Mail: seu@ethz.ch
www.ap.ethz.ch

Das „gläserne“ Tier: Ein- und Ausblicke in Genome und Gene von Haustieren

Gemeinsames Symposium der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina und der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW)
vom 10. bis 12. März 2010 in Wien

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 113, Nr. 388
Herausgegeben von Gottfried BREM (Wien)
(2012, 324 Seiten, 71 Abbildungen, 25 Tabellen, 26,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3028-1)

Der „gläserne Mensch“ hat einen negativen Beigeschmack, das „gläserne Tier“ bisher – noch? – nicht. Die Tierzucht will Tiere so „gläsern“ wie möglich machen: zu Recht, denn keine Industriegesellschaft kann ohne gute Landwirtschaft funktionieren. Der Band liefert einen umfassenden Überblick der Entwicklungen in der innovativen Tierzuchtforschung. Eine wesentliche Voraussetzung ist die Entschlüsselung der Genome. Genomsequenzierung und Genomanalyse sind bei einigen Nutztieren nahezu vollständig ausgeführt oder bereits abgeschlossen. In wenigen Jahren wird voraussichtlich eine ausreichende Kenntnis der Genome weiterer Arten erreicht sein. Die Verfügbarkeit der vollständigen DNA-Sequenz einer Art ermöglicht es nicht nur, gezielt nach merkmalsbeeinflussenden Varianten zu suchen, sondern auch effizienter, als dies zuvor möglich war, krankheitsverursachende Merkmale zu identifizieren und zielgerichtet aus einer Population zu eliminieren. Diese Kenntnisse, in Verbindung mit der Verfügbarkeit sehr diverser Rassen, ermöglichen die Auffindung wichtiger natürlicher genetischer Potenziale und deren sinnvolle Nutzung für eine effiziente zukünftige Nahrungsmittelproduktion.

IV. Geschlechtsabhängige Epigenetik

Elternspezifische Genomreprogrammierung in der Keimbahn und im frühen Embryo: Konsequenzen für die Entwicklung und das spätere Leben

Thomas HAAF (Würzburg)

Zusammenfassung

Bei Säugetieren finden in der Keimbahn und in der frühen Embryogenese zwei genomweite epigenetische Reprogrammierungswellen statt. Ei- und Samenzelle, die bei der Befruchtung zusammenkommen, tragen elternspezifische epigenetische Modifikationen, welche die Entwicklung der Nachkommen im väterlichen bzw. mütterlichen Sinn beeinflussen. Um Totipotenz der embryonalen Zellen herzustellen, muss ein „Interessenausgleich“ stattfinden. Im frühen Embryo werden fast alle Keimbahnmuster wieder gelöscht und durch somatische Muster ersetzt, die auf beiden elterlichen Chromosomen identisch sind. Nur wenige geprägte Gene behalten ihre Keimbahnmuster und elternspezifischen Aktivitäten während der gesamten weiteren Entwicklung bei.

Stochastische und/oder durch Umweltfaktoren induzierte Fehler (Epimutationen) in diesem hochkoordinierten Prozess können zu Krankheiten beitragen. Ein wichtiger Aspekt sind mögliche Effekte von assistierten Reproduktionstechniken auf die Genomreprogrammierung in der Keimbahn und im frühen Embryo. Da die gewebespezifischen Epigenome eines Individuums in frühen Entwicklungsphasen noch sehr viel plastischer sind als im späteren Leben, kann der fetale Metabolismus durch ungünstige intrauterine Umweltfaktoren, z. B. mütterliche Über- oder Unterernährung, fehlerhaft eingestellt werden. Das Konzept der fetalen Programmierung geht davon aus, dass zahlreiche Volkskrankheiten ihren Ursprung in der frühen Entwicklung haben (*Developmental Origins of Health and Disease*, DOHAD). Dies erfordert ein Umdenken bei der Prävention von metabolischen Krankheiten, die sich in vielen Industrieländern epidemieartig ausbreiten.

Abstract

In mammals two genome-wide epigenetic reprogramming waves occur in the germline and early embryogenesis, respectively. Oocyte and sperm that are combined at fertilization carry parent-specific epigenetic modifications, influencing development of the offspring in the paternal *versus* maternal interest. To restore totipotency of embryonal cells for somatic development, paternal and maternal interests must be balanced. Almost all germline patterns are erased in the early embryo and replaced by somatic patterns which are identical on both parental chromosomes. Only few imprinted genes maintain their germline patterns and parent-specific activities throughout further development.

Stochastic and/or environmentally induced errors (epimutations) in this highly coordinated process contribute to disease. Possible effects of assisted reproductive technologies on genome reprogramming in the germline and early embryo are one important aspect. Since the tissue-specific epigenomes of an individual are much more plastic during early development than later in life, the setting of the fetal metabolism can be disturbed by adverse intrauterine factors, such as maternal over- or undernutrition. The concept of fetal programming postulates that many civilization diseases have their origin in early development (*Developmental Origins of Health and Disease*, DOHAD). This requires a change of thinking to prevent the metabolic disease epidemics in developed countries.

1. Einleitung

Diploide Organismen haben einen väterlichen und einen mütterlichen Chromosomensatz. Durch Vorkern-Transfer-Experimente in einzelligen Mausembryonen (BARTON et al. 1984, McGRATH

Geprägte Gene sind oft in Clustern angeordnet und werden in der Regel nicht auf der Ebene des einzelnen Gens, sondern durch übergeordnete Imprintingkontrollregionen (ICRs) reguliert, die in der männlichen bzw. weiblichen Keimbahn unterschiedlich methyliert werden (EDWARDS und FERGUSON-SMITH 2007, HAAF 2012). Die ICR für die *IGF2-H19*-Region liegt stromaufwärts von *H19* und ist auf dem väterlichen Chromosom methyliert (Abb. 1). Auf dem väterlichen Chromosom kann *IGF2* mit Enhancer-Elementen stromabwärts von *H19* interagieren und wird deshalb exprimiert. Die unmethylierte ICR auf dem mütterlichen Chromosom bindet das CTCF-Protein (*CCCTC-binding factor*) und blockiert diese Interaktion, so dass anstelle von *IGF2* die benachbarte *H19*-RNA exprimiert werden kann (Abb. 1). Methylierungsstörungen der *IGF2-H19*-ICR sind mit reziproken Imprintingkrankheiten assoziiert. Eine Hypermethylierung und die dadurch bedingte *IGF2*-Überexpression (überschießende väterliche Aktivität) geht mit einem fetalen Riesnwuchs (Beckwith-Wiedemann-Syndrom [BWS]) einher, während die Hypomethylierung bzw. zu geringe *IGF2*-Expression (überschießende mütterliche Interessen) einen primordialen Kleinwuchs (Silver-Russel-Syndrom) verursacht (JACOB et al. 2013).

Die DNA-Methylierung (Abb. 2), genauer die Anheftung einer Methylgruppe an das Kohlenstoffatom 5 im Pyrimidinring von Cytosin durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs), ist eine epigenetische Modifikation der DNA selbst, welche eine entscheidende Rolle bei der zeitlich, örtlich und elternspezifisch hochkoordinierten Genregulation spielt. Die Methylierung findet hauptsächlich im Kontext von CpG (*cytosine-phosphate-guanine*)-Dinukleotiden statt, die mit etwa 28 Millionen im menschlichen Genom unterrepräsentiert sind (ROLLINS et al. 2006). Etwa 45 % der CpGs finden sich in repetitiven DNA-Elementen und sind methyliert, um deren Retrotranspositionsaktivität zu unterdrücken (YODER et al. 1997). Etwa 7 % der CpGs sind in sogenannten CpG-Inseln angereichert, die als cis-regulatorische Sequenzen im Promotorbereich von Genen und in ICRs fungieren. Die mit Promotoren assoziierten CpG-Inseln sind in der Regel unmethyliert. Die Promotormethylierung bei Entwicklung, Differenzierung und Krankheitsprozessen bedingt eine kondensierte inaktive Chromatinstruktur (Abb. 2) und Abschaltung des so verpackten Gens (JAENISCH und BIRD 2003, WEBER et al. 2007).

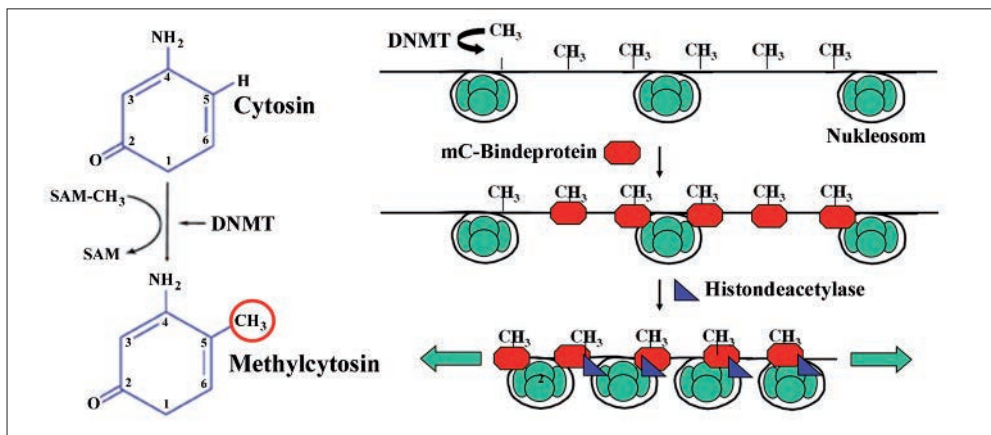


Abb. 2 DNA-Methylierung und Chromatinstruktur. Bei der DNA-Methylierung wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf das Kohlenstoffatom 5 im Cytosinring übertragen. Die methylierte DNA bindet Methylcytosin-Bindeproteine, welche dann Histondeacetylase und Chromatinremodellierungskomplexe rekrutieren. Dadurch entsteht eine kondensierte Chromatinstruktur, die von der Transkriptionsmaschinerie nicht mehr abgelesen werden kann.

Jeder der über 200 Zelltypen im Körper besitzt eine spezifische Kombination von aktiven (etwa 5–10 %) und inaktiven Genen, die in der Ontogenese programmiert wird und dann (aufgrund der symmetrischen Methylierung von CpG-Dinukleotiden im doppelsträngigen DNA-Molekül) bei DNA-Replikation und Zellteilung stabil weitervererbt werden kann. Berücksichtigt man die verschiedenen Entwicklungsstadien eines Organismus von der Befruchtung bis zum Tod, dann besitzt der Organismus zwar nur ein Genom (in jeder Körperzelle ist dieselbe DNA-Sequenz vorhanden), aber weit über 1000 Epigenome. Die Summe aller epigenetischen Modifikationen einer Zelle (Epigenom) bestimmt deren Genaktivitäten und damit Struktur und Funktion. Die epigenetische Vererbung (von Genaktivitätszuständen) beruht nicht auf irreversiblen Veränderungen (Mutationen) der Basenabfolge im DNA-Molekül, sondern auf reversiblen biochemischen Modifikationen. Sie unterliegt deshalb auch nicht den Mendelschen Regeln.

2. Genomreprogrammierungszyklus

Während Gametogenese und früher Embryogenese laufen zwei genomweite Reprogrammierungswellen mit Demethylierung und anschließender Remethylierung ab. In der Keimbahn (erste Welle) werden väterliche und mütterliche Genome elternspezifisch programmiert (Abb. 3). Zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der fetalen Entwicklung, wenn die primordialen Keimzellen in die Genitalleiste einwandern, werden zunächst alle (geprägten und somatischen) DNA-Methylierungsmuster vorangegangener Generationen gelöscht. Dies ist der einzige Zeitpunkt in der Entwicklung, zu dem die Keimzellen beider Geschlechter epigenetisch (funktionsell) gleichwertig sind. Die elternspezifischen Methylierungsmuster werden dann während der Keimzellentwicklung in der männlich bzw. weiblichen Keimbahn etabliert (HAJKOVA et al. 2002, ALLEGRUCCI et al. 2005). In der männlichen Keimbahn beginnt die Remethylierung in den Prospermatogonien nach dem pränatalen mitotischen Arrest und ist dann in den Spermatozyten am Ende des Pachytänstadiums abgeschlossen (ROUSSEAU et al. 2005, BOYANO et al. 2008). In der weiblichen Keimbahn beginnt die Remethylierung mit dem Oozytenwachstum (Übergang von Primär- zu Sekundärfollikeln) und dauert bis zum Metaphase-I-Stadium der Meiose (LUCIFERO et al. 2004, HIURA et al. 2006). Sowohl in männlichen als auch in weiblichen Keimzellen scheinen die Gene in einer spezifischen Reihenfolge methyliert zu werden. Manche maternalen Methylierungsimprints sind möglicherweise erst nach Befruchtung vollständig etabliert (EL-MAARRI et al. 2001).

In der zweiten Reprogrammierungswelle nach der Befruchtung werden die meisten Keimbahnmuster wieder gelöscht und somatische Methylierungsmuster für die Entwicklung des neuen Individuums hergestellt (REIK et al. 2001, HAAF 2006). Die genomweite Demethylierung des väterlichen und des mütterlichen Genoms in der Zygote und im frühen Embryo erfolgt aktiv (durch DNA-Demethylasen) und/oder passiv (durch DNA-Replikation ohne DNA-Methyltransferasen) und betrifft verschiedene repetitive und Einzelgensequenzen. Nur die ICRs von geprägten Genen sind durch einen unbekanntem Mechanismus vor dieser zweiten Demethylierungswelle geschützt und behalten ihre Keimbahnmuster bei (Abb. 3). Die *De-novo*-Methylierung erfolgt bevorzugt in der inneren Zellmasse des Blastozystenstadiums und dient der Etablierung somatischer Methylierungsmuster in den Vorläuferzellen der verschiedenen Keimblätter. Trophoblastzellen, die Vorläufer der extraembryonalen Gewebe, zeigen eine vergleichsweise niedrige Methylierung (SANTOS und DEAN 2004).

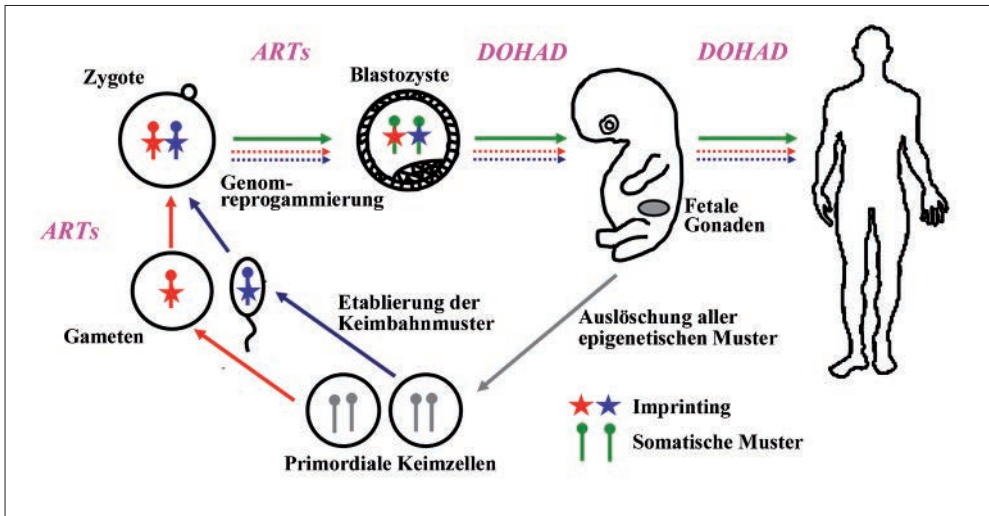


Abb. 3 Epigenetischer Reprogrammierungszyklus. In der fetalen Keimbahn werden alle DNA-Methylierungsmuster komplett gelöscht (graue Symbole) und in der Gametogenese paternale (blau) oder maternale (rot) DNA-Methylierungsmuster etabliert. Die zwei Keimbahn-Epigenome, die bei der Befruchtung kombiniert werden, machen im frühen Embryo eine elternspezifische Reprogrammierung durch, bei der die meisten Keimbahnmuster wieder gelöscht und durch somatische Muster (grün) ersetzt werden. Nur die geprägten Gene behalten ihre Keimbahnmuster während der Entwicklung des neuen Organismus bei. Assistierte Reproduktionstechniken (ARTs), die in sensiblen Phasen der späten Keimzellentwicklung und frühen Embryogenese einwirken, können die Genomreprogrammierung beeinflussen. Nach der „Developmental Origins of Health and Disease (DOHAD)“-Hypothese können auch ungünstige Umweltfaktoren, die in der frühen Entwicklung auf das Individuum einwirken, Krankheitsrisiken für das spätere Leben programmieren.

Die postzygotische Methylierung bestimmt den Aktivitätszustand von Gen-Sets bei Entwicklung und Differenzierung. Durch stochastische und/oder Umweltfaktoren bedingte Fehler bei der Etablierung, Aufrechterhaltung und/oder Löschung von Methylierungsmustern kann es zu Veränderungen der Genregulation kommen. Die Beiträge von solchen Epimutationen, die 10–100-mal häufiger sind als klassische genetische Mutationen (BENNETT-BAKER et al. 2003, GOYAL et al. 2006), zur phänotypischen Variation und Krankheitsentstehung wird bisher gewaltig unterschätzt (HORSTHEMKE 2006, EL HAJJ und HAAF 2013).

3. Epigenetische Effekte von assistierten Reproduktionstechniken (ARTs)

Zahlreiche Studien im Maus- oder Großtiermodell sowie epidemiologische Studien beim Menschen weisen darauf hin, dass verschiedene ARTs mit epigenetischen und phänotypischen Veränderungen assoziiert sind. Die *In-vitro*-Maturierung und ovarielle Stimulation von Eizellen, die physikalische Manipulation der Keimzellen bei *In-vitro*-Fertilisation (IVF) und intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) sowie die *In-vitro*-Kultur von Embryonen finden zu sensiblen Zeitpunkten in der späten Eizellentwicklung bzw. frühen Embryogenese statt, in denen das Genom elternspezifisch reprogrammiert wird (GRACE und SINCLAIR 2009, LAPRISE 2009, EL HAJJ und HAAF 2013). Da die Methylierungsreprogrammierung in den männlichen

Keimzellen bereits vor der Spermio-genese abläuft, sollte das Spermienepigenom weniger anfällig für ART-induzierte Störungen sein als das von Eizellen. Abnormale Methylierungsmuster in den Spermien sind mit schlechten Spermio-grammparametern (z. B. reduzierter Spermienzahl) und erniedrigten Schwangerschaftsraten nach ART assoziiert (MARQUES et al. 2008, KOBAYASHI et al. 2009, EL HAJJ et al. 2011b) und hängen wohl eher mit der männlichen Infertilität zusammen als mit der assistierten Reproduktion selbst.

Die ovarielle Stimulation mit exogenen Gonadotropinen (Superovulation) ist eine gängige Maßnahme bei der Infertilitätstherapie des Menschen und der Produktion von Labortieren, um die Anzahl der ovulierten Eizellen für IVF/ICSI zu erhöhen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Superovulation die Methylierung und Expression von Genen in Oozyten, Embryonen, Fetus und Plazenta negativ beeinflusst (FORTIER et al. 2008, MARKET-VELKER et al. 2010, FAUQUE 2013, LINKE et al. 2013). Dabei wurden in erster Linie geprägte Gene untersucht, die aufgrund ihrer Rolle bei Entwicklung und Differenzierung ein gutes Modell zur Analyse ART-induzierter Störungen darstellen (DENOMME und MANN 2012). Das Problem scheint dabei weniger die Etablierung der Methylierungsprints in der weiblichen Keimbahn zu sein als deren Aufrechterhaltung nach der Befruchtung (EL HAJJ et al. 2011a). Unterstützt wird diese Hypothese auch dadurch, dass die *In-vitro*-Kultur und Maturation von Eizellen, die ohne Superovulation gewonnen wurden, in Maus (TRAPPHOFF et al. 2010), Rind (HEINZMANN et al. 2011) und Mensch (KUHTZ et al. 2014) nicht zu einer signifikanten Zunahme von Methylierungsstörungen in den Oozyten führt.

Der am besten untersuchte und wahrscheinlich bedeutsamste Umweltfaktor bei der assistierten Reproduktion ist die Embryokultur (EL HAJJ und HAAF 2013). Studien im Maus- (DOHERTY et al. 2000, KHOSLA et al. 2001, SCHWARZER et al. 2012) und Großtiermodell (YOUNG et al. 1998) zeigen eindrucksvoll, dass verschiedene Embryokulturbedingungen, insbesondere die Zugabe von fetalem Kälberserum, zu aberranten Methylierungs- und Expressionsmustern von geprägten Genen führen. Die Imprintingstörungen entstehen wahrscheinlich zwischen Zweizell- und Blastozystenstadium und persistieren dann in verschiedenen Geweben, wobei die plazentalen Gewebe störungsanfälliger zu sein scheinen als der Embryo/Fet selbst (MANN et al. 2004, RIVERA et al. 2008). Die Embryokultur beeinflusst dabei nicht nur die embryonale/fetale Entwicklung, sondern auch den adulten Phänotyp der Nachkommen. Suboptimale Embryokulturbedingungen wurden mit Organomegalie, Glukoseintoleranz, Subfertilität, aber auch Verhaltensauffälligkeiten, Gedächtnisdefiziten und Entwicklungsstörungen des Nervensystems assoziiert (ECKER et al. 2004, FERNANDEZ-GONZALES et al. 2004, CALLE et al. 2012).

Die wenigen existierenden Daten an menschlichen Embryonen lassen vermuten, dass auch hier Methylierungsstörungen in geprägten Genen nach ART vorkommen (CHEN et al. 2010, IBALA-ROMDHANE et al. 2011). ART-Kinder haben ein leicht erhöhtes Risiko (Faktor 1,3–1,4) für angeborene Fehlbildungen (HANSEN et al. 2005), ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko für niedriges und sehr niedriges Geburtsgewicht (SCHIEVE et al. 2002), vermehrt perinatale Komplikationen (WISBORG et al. 2010), und ein möglicherweise deutlich (drei- bis neunfach) erhöhtes Risiko für einige sehr seltene Imprintingkrankheiten, wie BWS und Angelman-Syndrom (AS; HORSTHEMKE und LUDWIG 2005, AMOR und HALLIDAY 2008). Das absolute Risiko für ein ART-Kind mit BWS oder AS bleibt aber gering, so dass größere populationsbasierte Studien keine signifikant erhöhten Inzidenzen von Imprintingkrankheiten nach ART nachweisen konnten (BOWDIN et al. 2007, DOORNBOS et al. 2007). Interessanterweise liegt sowohl bei ART-Kindern mit BWS als auch mit AS eine abnormale Hypomethylierung des normalerweise

methylierten mütterlichen Allels (*LIT1* bzw. *SNRPN*) vor (HORSTHEMKE und LUDWIG 2005). Das „Large Offspring“-Syndrom, das bei der *In-vitro*-Produktion von Rindern und Schafen gehäuft auftritt und dem BWS beim Menschen ähnelt, wird ebenfalls durch aberrante Hypomethylierung eines geprägten Gens (*IGF2R*) erklärt (YOUNG et al. 2001).

4. Fetale Programmierung

Es ist heute weithin akzeptiert, dass die intrauterine Umgebung die Entwicklung des Kindes nachhaltig beeinflusst und den Gesundheitszustand im späteren Leben mitbestimmt. Der britische Epidemiologe David BARKER hat bereits vor über 20 Jahren einen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht, einem Indikator für ungünstige Umweltbedingungen *in utero*, und einem lebenslang erhöhten Risiko für kardiovaskuläre, metabolisch und andere komplexe Krankheiten hergestellt (BARKER et al. 1993). Die Erkenntnis, dass Volkskrankheiten ihren Ursprung in einer suboptimalen fetalen Entwicklung haben, wird heute als Barker-Hypothese oder *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHAD) bezeichnet (GILLMAN 2005). Eine ungünstige intrauterine Umwelt kann zu persistierenden Fehlprogrammierungen von Metabolismus, neuroendokrinen und anderen Funktionen des exponierten Feten führen, die erhöhte Krankheitsrisiken im späteren Leben bedingen. Es ist wahrscheinlich, dass epigenetische Mechanismen diesen Gen-Umwelt-Interaktionen zugrunde liegen. Obwohl die gewebespezifischen Epigenome des Organismus das ganze Leben hindurch von Umweltfaktoren modifiziert werden können, ist die epigenetische Plastizität in frühen Entwicklungsstadien am höchsten (GLUCKMAN et al. 2009).

Tierexperimente belegen den enormen Einfluss von stochastischen und intrauterinen Umweltfaktoren, insbesondere der Verfügbarkeit von Nährstoffen auf das Epigenom und den Phänotyp der Nachkommen. Ein besonders dramatisches Beispiel liefert das *Agouti viable yellow* (A^{vy})-Mausmodell, bei dem die Insertion eines IAP¹-Retrotransposons ein metastabiles Epiallel generiert hat. Durch zufällige IAP-Methylierung in der frühen Embryogenese werden die Expression des A^{vy} -Epiallels und der A^{vy} -Phänotyp, der durch eine gelbe Fellfarbe und Prädispositionen für metabolische Krankheiten und Krebs charakterisiert ist, unterdrückt (MORGAN et al. 1999). Die Supplementation der mütterlichen Diät mit Methylendonoren erhöht die Wahrscheinlichkeit der IAP-Methylierung und damit den Anteil der Nachkommen mit Pseudoagouti- (ähnlich dem Wildtyp; vollständige A^{vy} -Methylierung) und geflecktem (*mottled*; Mosaik-Methylierung) Phänotyp (WATERLAND et al. 2003). Die Exposition mit Bisphenol A oder Blei geht dagegen mit einer reduzierten Methylierung und einem erhöhten Anteil von A^{vy} -Phänotypen einher (ANDERSON et al. 2012).

Beim Menschen sind insbesondere die lebenslangen Auswirkungen von materno-fetaler Unterernährung gut dokumentiert. Die „holländische Hungerwinter“-Kohorte umfasst mehr als 2000 Geburten von 1943 bis 1947 in Amsterdam, wo schwangere Frauen wegen eines Embargos der Nazis 1944 nur 400–800 kcal täglich zur Verfügung hatten. Der Gesundheitszustand der heute 70-Jährigen wurde seit den 1990er Jahren systematisch untersucht. Individuen, die in der frühen Schwangerschaft einer intrauterinen Mangelsituation ausgesetzt waren, haben ein erhöhtes Risiko für metabolische, kardiovaskuläre und andere Volkskrankheiten, Schizo-

1 IAP – intracisternal A-type particle.

phrenie und vorzeitige kognitive Alterung (ROSEBOOM et al. 2006, SCHULZ 2010). Im Vergleich zu ihren nicht-exponierten Geschwisterkindern findet man subtile, aber statistisch signifikante Änderungen der DNA-Methylierung in einer Reihe von geprägten (z. B. *IGF2*) und nicht-geprägten (z. B. *LEP*, Leptin) Genen, die für Wachstum und Metabolismus relevant sind (HEJMANS et al. 2008, TOBI et al. 2009).

Das weitaus größere Problem in den meisten Ländern weltweit ist heute die fetale Überernährung. In hochentwickelten Ländern sind etwa 20 % der Schwangeren adipös oder sehr adipös am Beginn der Schwangerschaft, und bis zu 10 % entwickeln einen Gestationsdiabetes mellitus (GDM) in der Schwangerschaft (BEN-HAROUSH et al. 2004). Das Überangebot an Glukose und anderen Nährstoffen bedingt einen fetalen Hyperinsulinismus (BUCHANAN und XIANG 2005). Insulin als Wachstumsfaktor erklärt die Makrosomie der GDM-Kinder. Interessanterweise sind die Langzeitfolgen von fetaler Über- und Unterernährung ähnlich (U-förmige Risikokurve). Auch die intrauterine GDM-Exposition erhöht die Wahrscheinlichkeit der Nachkommen für metabolische, kardiovaskuläre und eine Reihe von Krebserkrankungen (WRIGHT et al. 2009, MOORE 2010, WU et al. 2012). Studien an diskordanten Geschwisterkindern, die geboren wurden, bevor oder nachdem die Mutter einen Diabetes entwickelt hat, unterstützen einen kausalen Zusammenhang zwischen intrauteriner Überernährung und den lebenslang erhöhten Krankheitsrisiken (DABELEA et al. 2000).

Verschiedene Studien haben in Nabelschnurblut und/oder Plazenta von GDM-Kindern veränderte Methylierungsmuster in metabolischen Genen, u. a. *LEP*, *ADIPOQ* (Adiponectin), *ABCA1* (*ATP-binding cassette transporter A1*), *MEST/PEG1* (*mesoderm-specific transcript homolog protein/paternally expressed gene 1*) und *NR3C1* (*nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1*; Glukokortikoidrezeptor), nachgewiesen (BOUCHARD et al. 2010, 2012, EL HAJJ et al. 2013, HOUDE et al. 2013) (Abb. 4). Von besonderem Interesse ist dabei das geprägte (väterlich exprimierte) *MEST*-Gen, das im Blut von übergewichtigen Erwachsenen hypomethyliert (EL HAJJ et al. 2013) und im Fettgewebe überexprimiert ist (KOSAKI et al. 2000). Im Mausmodell führt die Überexpression von *Mest* zu einer Vergrößerung der Adipozyten und Fettexpansion (KAMEI et al. 2007). Die *Mest*-Expression spielt bei der Maus eine wichtige Rolle bei der Entstehung der ernährungsbedingten Adipositas (KOZA et al. 2006, KOZAK et al. 2010). Es scheint deshalb plausibel anzunehmen, dass die Hypomethylierung von *MEST* in GDM-Kindern zu deren Prädisposition, im Lauf des Lebens eine Adipositas zu entwickeln, beiträgt (Abb. 4). Es wird vermutet, dass die fetale Programmierung in der Evolution der Säugetiere entstanden ist, um die Fitness der Mutter während und nach der Schwangerschaft zu erhöhen (WELLS 2007). Väterlich aktive Gene wie *MEST*, die das Wachstum steigern, sind Top-Kandidaten für die fetale Programmierung in einer intrauterinen Überflusssituation, während mütterlich aktive Gene wie *H19* das Wachstum begrenzen und wohl eher für die Anpassung an eine Mangelsituation wichtiger sind.

Genomweite Analysen mit DNA-Methylierungsarrays (RUCHAT et al. 2013, EL HAJJ et al. 2014) zeigen in GDM-Kindern eine Anreicherung von differentiell methylierten Genen in Stoffwechselwegen/Gen-Netzwerken, die mit metabolischen Krankheiten, kardiovaskulären Krankheiten und endokrinen Störungen assoziiert sind. Durch die intrauterine GDM-Exposition kommt es zu epigenetischen Veränderungen in zahlreichen Genen, wobei die einzelnen Veränderungen alle von geringer Effektstärke (Methylierungsveränderungen im Prozentbereich) sind. Dies ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass Volkskrankheiten multifaktoriell bedingt sind. Neben genetischen und Umweltfaktoren (z. B. physikalische Aktivität und Ernährung), spielen auch der Zufall und Gen-Umwelt-Interaktionen (Epigenetik) eine

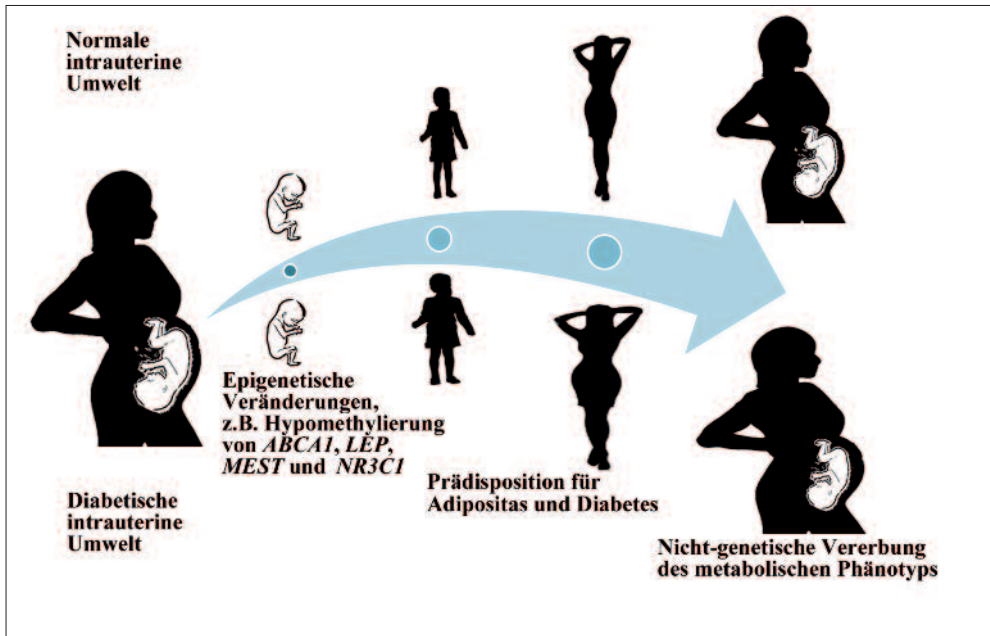


Abb. 4 „Teufelskreis“ der metabolischen Programmierung. Durch eine ungünstige, z. B. diabetische, intrauterine Umgebung kommt es zu epigenetischen Veränderungen in den Nachkommen, z. B. einer Hypomethylierung der Gene *ABCA1*, *LEP*, *MEST* und *NR3C1*. Durch diese Fehlprogrammierung steigt das Risiko, im späteren Leben Adipositas und/oder Diabetes zu entwickeln. Ist die Mutter in der F1-Generation adipös und/oder entwickelt einen GDM, kommt es *in utero* zu einer Fehlprogrammierung der F2-Generation in dieselbe Richtung, d. h., der metabolische Phänotyp wird nicht-genetisch weiter vererbt.

Rolle. Trotz enormer Forschungsanstrengungen und immer größeren genomweiten Assoziationsstudien erklären die bisher gefundenen Genvarianten nur einen kleinen Teil der oft hohen Heritabilität von Volkskrankheiten (MAHER 2008). Epigenetische Veränderungen könnten in erheblichem Umfang zu dieser „Missing Heritability“ beitragen.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Bei der Befruchtung kommen zwei sehr unterschiedliche Keimbahn-Epig Genome zusammen, die in ein totipotentes embryonales Epigenom reprogrammiert werden. Durch Entwicklung und Differenzierung entstehen daraus >1000 Gewebe- und Stadien-spezifische Epig Genome. Das bzw. die Epig Genome eines Individuums sind enorm dynamisch und werden sowohl durch stochastische als auch Umweltfaktoren beeinflusst (FAULK und DOLINOY 2011, FEIL und FRAGA 2012). Diese Plastizität ist in frühen, d. h. den embryonalen und fetalen, Entwicklungsphasen sehr viel höher als im späteren Leben (GLUCKMAN et al. 2009, LEHNEN et al. 2013). Wenn Volkskrankheiten ihren Ursprung zumindest teilweise in der frühen Entwicklung haben, dann müssen wir zur Prävention von metabolischen und kardiovaskulären Krankheiten dafür sorgen, dass perikonzeptionell und *in utero* optimale Umweltbedingungen vorliegen. Bisher wird eine

erfolgreiche Schwangerschaft durch die Geburt eines gesunden Kindes definiert, wir sollten in Zukunft aber auch die lebenslangen Krankheitsrisiken dieses Kindes mit berücksichtigen.

Es gibt wohl kaum eine dramatischere Veränderung der Umwelt als bei der assistierten Reproduktion im Vergleich zur natürlichen Konzeption. Was die medizinischen Risiken von ARTs betrifft, werden bisher in erster Linie die leicht erhöhte Fehlbildungsrate, die erhöhte perinatale Morbidität und einige seltene Imprintingkrankheiten diskutiert. Obwohl weltweit mehrere Millionen Menschen durch ARTs gezeugt wurden, gibt es kaum aussagekräftige Untersuchungen über mögliche Prädispositionen für komplexe Krankheiten im Erwachsenenalter. Ähnlich der „holländischen Hungerwinter“-Geburtskohorte, welche die Bedeutung der perikonzeptionellen Periode für das lebenslange Krankheitsrisiko eindrucksvoll gezeigt hat (ROSEBOOM et al. 2006, SCHULZ 2010), sind epidemiologische Langzeitstudien an den heute meist noch jungen durch ART gezeugten Menschen dringend erforderlich. Ein systematischer Vergleich der vielen verschiedenen ART-Protokolle ist schwierig, und es gibt deshalb keinen Konsensus, was optimale Umweltbedingungen „im Reagenzglas“ sind. Die Beobachtung, dass Superovulation (PELINCK et al. 2010) und Embryokulturbedingungen (DUMOULIN et al. 2010, NELISSEN et al. 2012) Einfluss auf das Geburtsgewicht haben, legt den Verdacht nahe, dass ARTs sich weit über die Präimplantationsphase hinaus auf die Entwicklung auswirken. Studien in Gambia, wo während der Regenzeit eine Mangelsituation herrscht, haben gezeigt, dass die Supplementation der mütterlichen Diät um den Zeitpunkt der Befruchtung herum, mit epigenetischen Veränderungen bei den Nachkommen assoziiert ist, die zumindest bis in das Kindesalter persistieren können (COOPER et al. 2012, KHULAN et al. 2012). Wenn schon die perikonzeptionelle maternale Ernährung solch langanhaltende Effekte hat, dann trifft dies wahrscheinlich erst recht für die verschiedenen Embryokulturbedingungen und ART-Protokolle zu.

Die epidemieartige Zunahme von metabolischen Krankheiten innerhalb nur einer Generation kann durch Überernährung und Bewegungsmangel allein kaum erklärt werden. Die fetale Programmierung des Metabolismus könnte hier einen wichtigen Beitrag liefern (Abb. 4). Ungünstige Expositionen *in utero*, z. B. bei maternaler Adipositas und/oder GDM, führen zu epigenetischen Veränderungen bei den Nachkommen, die das Risiko für eine metabolische Erkrankung im Lauf des Lebens erhöhen. Sind die Schwangeren der nächsten Generation dann wiederum adipös oder diabetisch, wird die ungünstige intrauterine Umwelt an die übernächste Generation weitergegeben und der metabolische Phänotyp nicht-genetisch vererbt. Nach dem Konzept der fetalen Programmierung (DOHAD) sind zur Prävention von Volkskrankheiten Maßnahmen zur Normalisierung der intrauterinen Umwelt sehr viel wirksamer als Veränderungen der Lebensweise im Jugend- und Erwachsenenalter, wenn die epigenetische Plastizität bereits sehr viel geringer ist. Studien an Geschwisterkindern von Schwangerschaften vor und nach einer (chirurgischen) Gewichtsreduktion der Mutter haben gezeigt, dass die nach Gewichtsabnahme der Mutter ausgetragenen Kinder ein erniedrigtes Risiko für Adipositas und metabolische Krankheiten haben (KRAL et al. 2006, SMITH et al. 2009). Bei maternaler Adipositas ist eine Gewichtsabnahme vor der Schwangerschaft also empfehlenswert, aber wahrscheinlich oft nur schwer zu erreichen. Auf jeden Fall sollte bei allen Schwangeren, insbesondere den Adipösen und solchen mit familiärer Belastung für Diabetes, der Blutzuckerspiegel regelmäßig kontrolliert und ein Glukosetoleranztest durchgeführt werden. Ein sich entwickelnder GDM muss durch diätetische Maßnahmen (ohne Hungern) und gegebenenfalls Insulin behandelt werden.

Epigenetische Veränderungen sind im Prinzip reversibel. Die Prädispositionen für metabolische und andere komplexe Krankheiten bei ungünstigen Expositionen *in utero*, können

möglicherweise durch pharmakologische, diätetische und Verhaltensmaßnahmen nach der Geburt normalisiert werden (LEHNEN et al. 2013). Im Rattenmodell konnten die Langzeitfolgen einer fetalen Unterernährung durch verschiedene postnatale Interventionen, z. B. eine Leptin-Behandlung der Neugeborenen (VICKERS et al. 2005), eine Gabe von Wachstumshormon in der Stillperiode (GRAY et al. 2013) oder eine Folsäure-Behandlung im jugendlichen Stadium (BURDGE et al. 2009), verhindert werden. Da der Mensch im Vergleich zu anderen Säugetieren relativ unreif geboren wird, kann man davon ausgehen, dass die Plastizität des Epigenoms auch nach der Geburt noch hoch ist und ein sensibles Zeitfenster zur Prävention von Volkskrankheiten im späteren Leben besteht. Forschung in dieser Richtung ist dringend notwendig. Ein erster Schritt wäre die Entwicklung von epigenetischen Markern zur Abschätzung des Ausmaßes der metabolischen Fehlprogrammierung *in utero* und zur Verlaufskontrolle nach der Geburt.

Literatur

- ALLEGRUCCI, C., THURSTON, A., LUCAS, E., and YOUNG, L.: Epigenetics and the germline. *Reproduction* 129, 137–149 (2005)
- AMOR, D. J., and HALLIDAY, J.: A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum. Reprod.* 23, 2826–2834 (2008)
- ANDERSON, O. S., NAHAR, M. S., FAULK, C., JONES, T. R., LIAO, C., KANNAN, K., WEINHOUSE, C., ROZEK, L. S., and DOLINOY, D. C.: Epigenetic responses following maternal dietary exposure to physiologically relevant levels of bisphenol A. *Environ. Mol. Mutagen.* 53, 334–432 (2012)
- BARKER, D. J., HALES, C. N., FALL, C. H., OSMOND, C., PHIPPS, K., and CLARK, P. M.: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36, 62–67 (1993)
- BARTON, S. C., SURANI, M. A. H., and NORRIS, M. L.: Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 311, 374–376 (1984)
- BEN-HAROUSH, A., YOGEV, Y., and HOD, M.: Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with type 2 diabetes. *Diab. Med.* 21, 103–113 (2004)
- BENNETT-BAKER, P. E., WILKOWSKI, J., and BURKE, D. T.: Age-associated activation of epigenetically repressed genes in the mouse. *Genetics* 165, 2055–2062 (2003)
- BOUCHARD, L., THIBAUT, S., GUAY, S. P., SANTURE, M., MONPETIT, A., ST-PIERRE, J., PERRON, P., and BRISSON, D.: Leptin gene epigenetic adaptation to impaired glucose metabolism during pregnancy. *Diab. Care* 33, 2436–2441 (2010)
- BOUCHARD, L., HIVERT, M. F., GUAY, S. P., ST-PIERRE, J., PERRON, P., and BRISSON, D.: Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration. *Diabetes* 61, 1272–1280 (2012)
- BOWDIN, S., BRUETON, L., ALLEN, C., HARRISON, R., KIRBY, G., MAHER, E. R., AFNAN, M., KIRKMAN-BROWN, J., BARRATT, C., and REARDON, W.: A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum. Reprod.* 22, 3237–3240 (2007)
- BOYANO, M. D., ANDOLLO, N., ZALDUENDO, M. M., and ARÉCHAGA, J.: Imprinting of mammalian male gametes is gene specific and does not occur at a single stage of differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 1105–1111 (2008)
- BUCHANAN, T. A., and XIANG, A. H.: Gestational diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 115, 485–491 (2005)
- BURDGE, G. C., LILLYCROP, K. A., PHILLIPS, E. S., SLATER-JEFFERIES, J. L., JACKSON, A. A., and HANSON, M. A.: Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J. Nutr.* 139, 1054–1060 (2009)
- CALLE, A., MIRANDA, A., FERNANDEZ-GONZALEZ, R., PERICUESTA, E., LAGUNA, R., and GUTIERREZ-ADAN, A.: Male mice produced by *in vitro* culture have reduced fertility and transmit organomegaly and glucose intolerance to their male offspring. *Biol. Reprod.* 87, 34 (2012)
- CHEN, S. L., SHI, X. Y., ZHENG, H. Y., WU, F. R., and LUO, C.: Aberrant DNA methylation of imprinted H19 gene in human preimplantation embryos. *Fertil. Steril.* 94, 2356–2358 (2010)
- COOPER, W. N., KHULAN, B., OWENS, S., ELKS, C. E., SEIDEL, V., PRENTICE, A. M., BELTEKI, G., ONG, K. K., AFFARA, N. A., CONSTÂNCIA, M., and DUNGER, D. B.: DNA methylation profiling at imprinted loci after periconceptional micronutrient supplementation in humans: results of a pilot randomized controlled trial. *FASEB J.* 26, 1782–1790 (2012)

- DABELEA, D., HANSON, R. L., LINDSAY, R. S., PETTITT, D. J., IMPERATORE, G., GABIR, M. M., ROUMAIN, J., BENNETT, P. H., and KNOWLER, W. C.: Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* 49, 2208–2211 (2000)
- DENOMME, M. M., and MANN, M. R.: Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during ARTs. *Reproduction* 144, 393–409 (2012)
- DOHERTY, A. S., MANN, M. R., TREMBLAY, K. D., BARTOLOMEI, M. S., and SCHULTZ, R. M.: Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* 62, 1526–1535 (2000)
- DOORBOS, M. E., MAAS, S. M., McDONNELL, J., VERMEIDEN, J. P., and HENNEKAM, R. C.: Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: A Dutch study. *Hum. Reprod.* 22, 2476–2480 (2007)
- DUMOULIN, J. C., LAND, J. A., VAN MONTFOORT, A. P., NELISSEN, E., COONEN, E., DERHAAG, J. G., SCHREURS, I. L., DUNSELMAN, G. A., KESTER, A. D., GERAEDTS, J. P., and EVERS, J. L.: Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum. Reprod.* 25, 605–612 (2010)
- ECKER, D. J., STEIN, P., XU, Z., WILLIAMS, C. J., KOPF, G. S., BILKER, W. B., ABEL, T., and SCHULTZ, R. M.: Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1595–1600 (2004)
- EDWARDS, C. A., and FERGUSON-SMITH, A. C.: Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 281–289 (2007)
- EL HAJJ, N., and HAAF, T.: Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertil. Steril.* 99, 632–641 (2013)
- EL HAJJ, N., PLIUSHCH, G., SCHNEIDER, E., DITTRICH, M., MÜLLER, T., KORENKOV, M., ARETZ, M., ZECHNER, U., LEHNEN, H., and HAAF, T.: Metabolic programming of MEST DNA methylation by intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 62, 1320–1328 (2013)
- EL HAJJ, N., SCHNEIDER, E., LEHNEN, H., and HAAF, T.: Diabetes, epigenetics and the life-long consequences of an adverse intrauterine environment. *Reproduction* 148, R111–120 (2014)
- EL HAJJ, N., TRAPPHOFF, T., LINKE, M., MAY, A., HANSMANN, T., KUHTZ, J., REIFENBERG, K., HEINZMANN, J., NIEMANN, H., DASER, A., EICHENLAUB-RITTER, U., ZECHNER, U., and HAAF, T.: Limiting dilution bisulfite (pyro)sequencing reveals parent-specific methylation patterns in single early mouse embryos and bovine oocytes. *Epigenetics* 6, 1176–1188 (2011a)
- EL HAJJ, N., ZECHNER, U., SCHNEIDER, E., TRESCH, A., GROMOLL, J., HAHN, T., SCHORSCH, M., and HAAF, T.: Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sex. Dev.* 5, 60–69 (2011b)
- EL-MAARRI, O., BUITING, K., PEERY, E. G., KROISEL, P. M., BALABAN, B., WAGNER, K., URMAN, B., HEYD, J., LICH, C., BRANNAN, C. I., WALTER, J., and HORSTHEMKE, B.: Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nature Genet.* 27, 341–344 (2001)
- FAULK, C., and DOLINOV, D. C.: Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics* 6, 791–797 (2011)
- FAUQUE, P.: Ovulation induction and epigenetic anomalies. *Fertil. Steril.* 99, 616–623 (2013)
- FEIL, R., and FRAGA, M. F.: Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Rev. Genet.* 13, 97–109 (2012)
- FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R., MOREIRA, P., BILBAO, A., JIMÉNEZ, A., PÉREZ-CRESPO, M., RAMÍREZ, M. A., RODRÍGUEZ DE FONSECA, F., PINTADO, B., and GUTIÉRREZ-ADÁN, A.: Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 5880–5885 (2004)
- FORTIER, A. L., LOPES, F. L., DARRICARRERE, N., MARTEL, J., and TRASLER, J. M.: Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1653–1665 (2008)
- GILLMAN, M. W.: Developmental origins of health and disease. *New Engl. J. Med.* 353, 1848–1850 (2005)
- GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A., BUKLIJAS, T., LOW, F. M., and BEEDLE, A. S.: Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nature Rev. Endocrinol.* 5, 401–408 (2009)
- GOYAL, R., REINHARDT, R., and JELTSCH, A.: Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 34, 1182–1188 (2006)
- GRACE, K. S., and SINCLAIR, K. D.: Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking. *Semin. Reprod. Med.* 27, 409–416 (2009)
- GRAY, C., LI, M., REYNOLDS, C. M., and VICKERS, M. H.: Pre-weaning growth hormone treatment reverses hypertension and endothelial dysfunction in adult male offspring of mothers undernourished during pregnancy. *PLOS ONE* 8, e53505 (2013)
- GREGG, C., ZHANG, J., WEISSBOURD, B., LUO, S., SCHROTH, G. P., HAIG, D., and DULAC, C.: High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. *Science* 329, 643–648 (2010)

- HAAF, T.: Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *10*, 13–22 (2006)
- HAAF, T.: Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. In: MEYERS R. A. (Ed.): *Epigenetic Regulation and Epigenomics. Advances in Molecular Biology and Medicine. Vol. 1*, pp. 601–628. Weinheim: Wiley-Blackwell 2012
- HAIKOVA, P., ERHARDT, S., LANE, N., HAAF, T., EL-MAARRI, O., REIK, W., WALTER, J., and SURANI, M. A.: Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* *117*, 15–23 (2002)
- HANSEN, M., BOWER, C., MILNE, E., KLERK, N. DE, and KURINCZUK, J.: Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects: a systematic review. *Hum. Reprod.* *20*, 328–338 (2005)
- HEIJMANS, B. T., TOBI, E. W., STEIN, A. D., PUTTER, H., BLAUW, G. J., SUSSER, E. S., SLAGBOOM, P. E., and LUMEY, L. H.: Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 17046–17049 (2008)
- HEINZMANN, J., HANSMANN, T., HERRMANN, D., WRENZYCKI, C., ZECHNER, U., HAAF, T., and NIEMANN, H.: Epigenetic profile of developmentally important genes in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* *78*, 188–201 (2011)
- HIURA, H., OBATA, Y., KOMIYAMA, J., SHIRAI, M., and KONO, T.: Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice. *Genes Cells* *11*, 353–361 (2006)
- HORSTHEMKE, B.: Epimutations in human disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *310*, 45–59 (2006)
- HORSTHEMKE, B., and LUDWIG, M.: Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum. Reprod. Update* *11*, 473–482 (2005)
- HOUDE, A. A., GUAY, S. P., DESGAGNÉ, V., HIVERT, M. F., BAILLARGEON, J. P., ST-PIERRE, J., PERRON, P., GAUDET, D., BRISSON, D., and BOUCHARD, L.: Adaptations of placental and cord blood ABCA1 DNA methylation profile to maternal metabolic status. *Epigenetics* *8*, 1289–1302 (2013)
- IBALA-ROMDHANE, S., AL-KHTIB, M., KHOUEIRY, R., BLACHERE, T., GUERIN, J. F., and LEFEBVRE, A.: Analysis of H19 methylation in control and abnormal human embryos, sperm and oocytes. *Eur. J. Hum. Genet.* *19*, 1138–1143 (2011)
- JACOB, K. J., ROBINSON, W. P., and LEFEBVRE, L.: Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: opposite developmental imbalances in imprinted regulators of placental function and embryonic growth. *Clin. Genet.* *84*, 326–334 (2013)
- JAENISCH, R., and BIRD, A.: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genet.* *33*, 245–254 (2003)
- KAMEI, Y., SUGANAMI, T., KOHDA, T., ISHINO, F., YASUDA, K., MIURA, S., EZAKI, O., and OGAWA, Y.: Peg1/Mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. *FEBS Lett.* *581*, 91–96 (2007)
- KHOSLA, S., DEAN, W., BROWN, D., REIK, W., and FEIL, R.: Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol. Reprod.* *64*, 918–926 (2001)
- KHULAN, B., COOPER, W. N., SKINNER, B. M., BAUER, J., OWENS, S., PRENTICE, A. M., BELTEKI, G., CONSTANCIA, M., DUNGER, D., and AFFARA, N. A.: Periconceptional maternal micronutrient supplementation is associated with widespread gender related changes in the epigenome: a study of a unique resource in the Gambia. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 2086–2101 (2012)
- KOBAYASHI, H., HIURA, H., JOHN, R. M., SATO, A., OTSU, E., KOBAYASHI, N., SUZUKI, R., SUZUKI, F., HAYASHI, C., UTSUNOMIYA, T., YAEGASHI, N., and ARIMA, T.: DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur. J. Hum. Genet.* *17*, 1582–1591 (2009)
- KOSAKI, K., KOSAKI, R., CRAIGEN, W. J., and MATSUO, N.: Isoform-specific imprinting of the human PEG1/MEST gene. *Amer. J. Hum. Genet.* *66*, 309–312 (2000)
- KOZA, R. A., NIKONOVA, L., HOGAN, J., RIM, J. S., MENDOZA, T., FAULK, C., SKAF, J., and KOZAK, L. P.: Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. *PLOS Genet.* *2*, e81 (2006)
- KOZAK, L. P., NEWMAN, S., CHAO, P. M., MENDOZA, T., and KOZA, R. A.: The early nutritional environment of mice determines the capacity for adipose tissue expansion by modulating genes of caveolae structure. *PLOS ONE* *5*, e11015 (2010)
- KRAL, J. G., BIRON, S., SIMARD, S., HOULD, F. S., LEBEL, S., MARCEAU, S., and MARCEAU, P.: Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years. *Pediatrics* *118*, e1644–1649 (2006)
- KUHTZ, J., ROMERO, S., VOS, M. DE, SMITZ, J., HAAF, T., and ANCKAERT, E.: Human in vitro oocyte maturation is not associated with increased imprinting error rates at LIT1, SNRPN, PEG3 and GTL2. *Hum. Reprod.* *29*, 1995–2005 (2014)
- LAPRISE, S. L.: Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies. *Mol. Reprod. Dev.* *76*, 1006–1018 (2009)

- LEHNEN, H., ZECHNER, U., and HAAF, T.: Epigenetics of gestational diabetes mellitus and offspring health: the time for action is in early stages of life. *Mol. Hum. Reprod.* *19*, 415–422 (2013)
- LI, E.: Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Rev. Genet.* *3*, 662–673 (2002)
- LINKE, M., MAY, A., REIFENBERG, K., HAAF, T., and ZECHNER, U.: The impact of ovarian stimulation on the expression of candidate reprogramming genes in mouse preimplantation embryos. *Cytogenet. Genome Res.* *139*, 71–79 (2013)
- LUCIFERO, D., MANN, M. R., BARTOLOMEI, M. S., and TRASLER, J. M.: Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 839–849 (2004)
- MAHER, B.: Personal genomes: the case of the missing heritability. *Nature* *456*, 18–21 (2008)
- MANN, M. R., LEE, S. S., DOHERTY, A. S., VERONA, R. I., NOLEN, L. D., SCHULTZ, R. M., and BARTOLOMEI, M. S.: Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* *131*, 3727–3735 (2004)
- MARKET-VELKER, B. A., ZHANG, L., MAGRI, L. S., BONVISSUTO, A. C., and MANN, M. R.: Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 36–51 (2010)
- MARQUES, C. J., COSTA, P., VAZ, B., CARVALHO, F., FERNANDES, S., BARROS, A., and SOUSA M.: Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.* *14*, 67–74 (2008)
- MCGRATH, J., and SOLTER, D.: Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* *37*, 179–183 (1984)
- MOORE, T. R.: Fetal exposure to gestational diabetes contributes to subsequent adult metabolic syndrome. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* *202*, 643–649 (2010)
- MOORE, T., and HAIG, D.: Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet.* *7*, 45–49 (1991)
- MORGAN, H. D., SUTHERLAND, H. G., MARTIN, D. I., and WHITELAW, E.: Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genet.* *23*, 314–318 (1999)
- MURPHY, S. K., and JIRTLE, R. L.: Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays* *25*, 577–588 (2003)
- NELISSEN, E. C., VAN MONTFORT, A. P., COONEN, E., DERHAAG, J. G., GERAEDTS, J. P., SMITS, L. J., LAND, J. A., EVERS, J. L., and DUMOULIN, J. C.: Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Hum. Reprod.* *27*, 1966–1976 (2012)
- PELINCK, M. J., HADDERS-ALGRA, M., HAADSMA, M. L., NIJHUIS, W. L., KIEWIET, S. M., HOEK, A., HEINEMAN, M. J., and MIDDELBURG, K. J.: Is the birthweight of singletons born after IVF reduced by ovarian stimulation or by IVF laboratory procedures? *Reprod. Biomed. Online* *21*, 245–251 (2010)
- REIK, W., CONSTÂNCIA, M., FOWDEN, A., ANDERSON, N., DEAN, W., FERGUSON-SMITH, A., TYCKO, B., and SIBLEY, C.: Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *J. Physiol.* *547*, 35–44 (2003)
- REIK, W., DEAN, W., and WALTER, J.: Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* *293*, 1089–1093 (2001)
- RIVERA, R. M., STEIN, P., WEAVER, J. R., MAGER, J., SCHULTZ, R. M., and BARTOLOMEI, M. S.: Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1–14 (2008)
- ROLLINS, R. A., HAGHIGHI, F., EDWARDS, J. R., DAS, R., ZHANG, M. Q., JU, J., and BESTOR, T. H.: Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res.* *16*, 157–163 (2006)
- ROSEBOOM, T., ROOIJ, S. DE, and PAINTER, R.: The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum. Dev.* *82*, 485–491 (2006)
- ROUSSEAU, S., CARON, C., GOVIN, J., LESTRAT, C., FAURE, A. K., and KHOCHBIN, S.: Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* *345*, 139–153 (2005)
- RUCHAT, S. M., HOUE, A. A., VOISIN, G., ST-PIERRE, J., PERRON, P., BAILLARGEON, J. P., GAUDET, D., HIVERT, M. F., BRISSON, D., and BOUCHARD, L.: Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics* *8*, 935–943 (2013)
- SANTOS, F., and DEAN, W.: Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* *127*, 643–651 (2004)
- SCHIEVE, A. A., MEIKLE, S. F., FERRE, C., PETERSON, H. B., JENG, G., and WILCOX, L. S.: Low and very low birth weights in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *New Engl. J. Med.* *346*, 731–737 (2002)
- SCHULZ, L. C.: The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 16757–16758 (2010)
- SCHWARZER, C., ESTEVES, T. C., ARAÚZO-BRAVO, M. J., LE GAC, S., NORDHOFF, V., SCHLATT, S., and BIOIANI, M.: ART culture conditions change the probability of mouse embryo gestation through defined cellular and molecular responses. *Hum. Reprod.* *27*, 2627–2640 (2012)

- SMITH, J., CIANFLONE, K., BIRON, S., HOULD, F. S., LEBEL, S., MARCEAU, S., LESCELLEUR, O., BIERTHO, L., SIMARD, S., KRAL, J. G., and MARCEAU, P.: Effects of maternal surgical weight loss in mothers on intergenerational transmission of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *94*, 4275–4283 (2009)
- TOBI, E. W., LUMEY, L. H., TALENS, R. P., KREMER, D., PUTTER, H., STEIN, A. D., SLAGBOOM, P. E., and HEIJMANS, B. T.: DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 4046–4053 (2009)
- TRAPPHOFF, T., EL HAJJ, N., ZECHNER, U., HAAF, T., and EICHENLAUB-RITTER, U.: DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of oocytes from vitrified pre-antral follicles. *Hum. Reprod.* *25*, 3025–3042 (2010)
- VICKERS, M. H., GLUCKMAN, P. D., COVENY, A. H., HOFMAN, P. L., CUTFIELD, W. S., GERTLER, A., BREIER, B. H., and HARRIS, M.: Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* *146*, 4211–4216 (2005)
- WATERLAND, R. A., and JIRTLE, R. L.: Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5293–5300 (2003)
- WEBER, M., HELLMANN, I., STADLER, M. B., RAMOS, L., PÄÄBO, S., REBHAN, M., and SCHÜBELER, D.: Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genet.* *39*, 457–466 (2007)
- WELLS, J. C.: The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *82*, 143–172 (2007)
- WISBORG, K., INGERSLEV, H. J., and HENRIKSEN, T. B.: In vitro fertilization and preterm delivery, low birth weight, and admission to the neonatal intensive care unit: a prospective follow-up study. *Fertil. Steril.* *94*, 2102–2106 (2010)
- WRIGHT, C. S., RIFAS-SHIMAN, S. L., RICH-EDWARDS, J. W., TAVERAS, E. M., GILLMAN, M. W., and OKEN, E.: Intrauterine exposure to gestational diabetes, child adiposity, and blood pressure. *Amer. J. Hypertens.* *22*, 215–220 (2009)
- WU, C. S., NOHR, E. A., BECH, B. H., VESTERGAARD, M., and OLSEN, J.: Long-term health outcomes in children born to mothers with diabetes: a population-based cohort study. *PLOS ONE* *7*, e36727 (2012)
- YODER, J. A., WALSH, C. P., and BESTOR, T. H.: Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* *13*, 335–340 (1997)
- YOUNG, L. E., FERNANDES, K., McEVOY, T. G., BUTTERWITH, S. C., GUTIERREZ, C. G., CAROLAN, C., BROADBENT, P. J., ROBINSON, J. J., WILMUT, I., and SINCLAIR, K. D.: Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genet.* *27*, 153–154 (2001)
- YOUNG, L. E., SINCLAIR, K. D., and WILMUT, I.: Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* *3*, 155–163 (1998)

Prof. Dr. Thomas HAAF
Institut für Humangenetik
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Biozentrum
Am Hubland
97074 Würzburg
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 931 3188738
Fax: +49 931 3187938
E-Mail: thomas.haaf@uni-wuerzburg.de

Was ist Leben?

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung
vom 23. bis 25. September 2011 zu Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 116, Nr. 394
Herausgegeben von Jörg HACKER (Halle/Saale)
und Michael HECKER (Greifswald)
(2012, 284 Seiten, 115 Abbildungen, 3 Tabellen, 29,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-3060-1)

Es gibt nur wenige Fragen, welche die Menschheit seit Beginn ihrer geistigen Auseinandersetzung mit sich selbst und der sie umgebenden Welt unaufhörlich begleitet haben. „Was ist Leben?“ zählt zu diesen Grundfragen des menschlichen Daseins. Angesichts der beeindruckenden Erfolge der empirischen Forschung an Lebewesen wird die Schwierigkeit immer offenkundiger, eine allgemein überzeugende Antwort auf die Frage nach den grundlegenden Eigenschaften derjenigen Systeme zu geben, die wir „lebendig“ nennen. Diese Rätselhaftigkeit fasziniert Natur-, Geistes- und Kulturwissenschaftler und bringt sie dazu, gemeinsam das Wesen des Lebens zu erkunden. In dem Band behandeln hervorragende Vertreter der unterschiedlichsten Wissenschaftsdisziplinen den noch nicht zufriedenstellend geklärten Ursprung des Lebens. Sie untersuchen das neue, umfassende Verständnis der molekularen Grundlagen von Lebensprozessen aus der Sicht der Genomforschung und beschreiben die Möglichkeiten, Leben in Analogie zu Maschinen zu modellieren. Sie behandeln die ungeheure Vielfalt des Lebens, die Beeinflussbarkeit des Lebens durch menschliche Eingriffe und die Grenzen des Lebens aus biologischer, psychologischer und philosophischer Sicht. Dabei wird deutlich, wie hartnäckig sich die Frage nach dem Leben durch die Wissenschaftsgeschichte, ja durch die ganze Geistesgeschichte zieht und welche Brisanz sie angesichts aktueller Forschungsergebnisse erhalten hat.

Genetisches Imprinting für Muskelmasse und Fettansatz bei der Maus

Gudrun A. BROCKMANN und Stefan KARST (Berlin)

Zusammenfassung

Die aufgeführten Beispiele demonstrieren, dass sich mittels quantitativ genetischer Verfahren *Parent-of-Origin*-Effekte im Genom identifizieren lassen. Strukturierte Populationen aus Inzucht- oder Auszuchtpopulationen, die unter kontrollierten Umweltbedingungen gehalten werden, sind dafür gut geeignet. Wir konnten zeigen, dass *Parent-of-Origin*-Effekte auch vorhanden sein können, wenn an den identifizierten Loci keine direkten additiv oder dominanten Effekte wirken. *Parent-of-Origin*-Effekte sind bis zu einem unterschiedlichen juvenilen oder frühen adulten Lebensalter als phänotypische Effekte sichtbar. Neben bekannten genetischen Imprintingeffekten können über die strukturierte genomweite Suche neue Imprintingeffekte identifiziert werden. Wahrscheinlich werden *Parent-of-Origin*-Effekte über mehrere Generationen vererbt. Abschließend soll jedoch unterstrichen werden, dass die identifizierten *Parent-of-Origin*-Effekte möglicherweise durch wirkende maternale Effekte beeinflusst und von maternalen Imprintingeffekten nicht unterschieden werden können.

Abstract

The documented examples demonstrate the power of quantitative genetic approaches for the identification of parent-of-origin effects in the genome. Structured populations from inbred or outbred populations, which are maintained under controlled environmental conditions, are well suited for mapping parent-of-origin effects. We could show that parent-of-origin effects can be present at genomic loci even when no direct additive or dominant effects act at these loci. Parent-of-origin effects are visible as phenotypic effects until different juvenile or early adult ages. Besides known genetic imprinting effects, additional imprinting effects can be identified via structured genome wide screens. Probably, parent-of-origin effects are passed on over several generations. Eventually, identified parent-of-origin effects could be influenced by acting maternal effects which cannot be distinguished from maternal imprinting effects.

1. Einleitung

Im vorliegenden Beitrag möchten wir Antworten auf zwei Fragen geben:

- Wie kann genetisches Imprinting quantitativ nachgewiesen werden?
- Welche messbaren Effekte kann Imprinting haben?

Bei der Beantwortung der Fragen werden vor allem Ergebnisse aus eigenen Untersuchungen von Mausmodellen verwendet.

Zu den Faktoren, die die Merkmalsausprägung beeinflussen, gehören Genetik, Epigenetik sowie die Umwelt. Zu den genetischen Faktoren zählen die direkten additiven und dominanten Genwirkungen, die bereits MENDEL aufgedeckt und ausführlich beschrieben hat, die Epistasie, die die Gen-Gen-Wechselwirkung erfasst, die Pleiotropie, die ausdrückt,

dass ein Gen mehrere Merkmale beeinflusst, und das Geschlecht, dessen Wirkung auf die Sex-Chromosomen und Mitochondrien zurückzuführen ist. Daneben wirken epigenetische Faktoren. Die Ursachen für epigenetische Beeinflussung der Merkmalsausprägung liegen in chemischen Modifikationen wie Methylierungen der DNA und Acetylierungen der DNA-Bindungsproteine sowie in Interaktionen von kleinen RNAs mit anderen RNAs oder der DNA. Methylierungen der DNA an CpG-Dinukleotiden und Acetylierung von Histonen führen zur dichten Packung von DNA, so dass die Transkription des betroffenen Gens gestört ist und Nachbargene häufig co-reguliert werden. Die bekanntesten epigenetischen Effekte sind genetisches Imprinting, ontogenetisches Imprinting und metabolisches Imprinting.

Unter genetischem Imprinting verstehen wir die Beobachtung, dass ein und dasselbe Allel in Abhängigkeit davon, ob es vom Vater oder von der Mutter vererbt wird, bei den Nachkommen eine unterschiedliche Merkmalsausprägung hervorruft. Das genetische Imprinting wird auch als parentales Imprinting oder *Parent-of-Origin*-Effekt bezeichnet. Die Verwendung des Begriffs „Parent-of-Origin“ berücksichtigt, dass die durch die maternalen Gameten verursachten Effekte nicht vollständig von den durch die Mutter während der Trächtigkeit und Säugeperiode hervorgerufenen maternalen Effekten getrennt werden können. Das ontogenetische Imprinting bezieht sich auf die Beeinflussung der Genaktivität durch epigenetische Effekte im Laufe der Individualentwicklung in Abhängigkeit davon, ob Gene für das Wachstum und die Differenzierung benötigt werden oder nicht. Das metabolische Imprinting ist das am besten untersuchte Imprinting in Wechselwirkung auf unterschiedliche Ernährung als Spezialfall des Einflusses von Umweltfaktoren. Erwähnt werden soll an dieser Stelle auch, dass die Entstehung verschiedener Krebsarten mit anomalen epigenetischen DNA-Mustern von Zellen in Verbindung gebracht wird.

2. Quantitativer Nachweis von genetischem Imprinting

Für die Identifizierung von genomischen Loci, die genetisches Imprinting beeinflussen, eignen sich sehr gut strukturierte Populationen. In Kreuzungen zwischen verschiedenen Inzuchtlinien können in einer F_2 -Generation die Genotypen AA, Aa und aa an einem Markerlocus unterschieden werden. Um das genetische Imprinting untersuchen zu können, muss die Möglichkeit bestehen, von den heterozygoten Tieren die Übertragung sowohl des väterlichen als auch des mütterlichen Allels genau zuzuordnen zu können. Deshalb ist es notwendig, ausgehend von der Kreuzung von Inzuchtlinien mindestens eine F_3 -Generation zu produzieren. In der F_3 -Generation lassen sich dann die heterozygoten Tiere in die beiden Genotypenklassen Aa und aA einordnen, wobei das erste Allel paternaler und das zweite Allel maternaler Herkunft ist. Die Differenz der Mittelwerte zwischen diesen beiden heterozygoten Genotypenklassen ist der doppelte genetische Imprintingeffekt (2i). Die Indexbewertung für additive (a), dominante (d) und Imprintingeffekte (i) an jedem Markerlocus in jedem Tier einer F_3 -Generation erfolgt nach folgendem Prinzip (MANTEY et al. 2005):

$$\begin{bmatrix} \overline{AA} \\ \overline{Aa} \\ \overline{aA} \\ \overline{aa} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r \\ a \\ d \\ i \end{bmatrix} \quad [1]$$

AA, Aa, aA und **aa** repräsentieren die vier Genotypen, **r** ist der Mittelwert zwischen beiden homozygoten Genotypenklassen, **a** zeigt den additiv genetischen Effekt, d. h. die Hälfte der Differenz zwischen den Mittelwerten beider homozygoten Klassen, **d** gibt den dominanten genetischen Effekt an, d. h. die Differenz zwischen dem Mittelwert aller Heterozygoten und dem Mittelwert beider homozygoten Genotypenklassen, **i** bezeichnet den Imprintwert, d. h. die Hälfte der Differenz zwischen den Mittelwerten beider heterozygoten Klassen. Für die Schätzwerte der Parameter ergibt sich folgende Matrix:

$$\begin{bmatrix} r \\ a \\ d \\ i \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\overline{AA}}{2} + \frac{\overline{aa}}{2} \\ \frac{\overline{AA}}{2} - \frac{\overline{aa}}{2} \\ \frac{\overline{Aa}}{2} + \frac{\overline{aA}}{2} - \frac{\overline{AA}}{2} - \frac{\overline{aa}}{2} \\ \frac{\overline{Aa}}{2} - \frac{\overline{aA}}{2} \end{bmatrix} \quad [2]$$

Ein statistischer Test auf phänotypische Unterschiede zwischen den beiden Heterozygotenklassen **Aa** und **aA** an einem Markerlocus gibt schließlich den Hinweis auf Imprintingeffekte in der mit dem genotypisierten Marker gekoppelten Ort im Genom. Wird das gesamte Genom mit genetischen Markern abgedeckt (etwa 150 gleichmäßig verteilte Marker für das Mausgenom und eine F_3 -Population), kann das gesamte Genom systematisch auf Imprintingeffekte abgesucht werden.

Im Fall von Auszuchtpopulationen ist für die Identifizierung von Imprintingeffekten keine Erzeugung von F_3 -Populationen notwendig. Da in Auszuchtpopulationen mehr als zwei Allele segregieren können und alle Tiere in der Regel an vielen Orten im Genom heterozygot sind, lassen sich schon in der ersten Nachkommengeneration paternale und maternale Allele bei den Nachkommen zuordnen. Der Nachteil von Auszuchtpopulationen besteht jedoch darin, dass der genetische Hintergrund sehr heterogen ist, was das statistisch sichere Auffinden von Imprintingeffekten erschwert.

3. Beispiele für Imprintingeffekte aus Experimenten mit der Maus

3.1 Imprintingeffekte auf Körperzusammensetzung in der Kreuzung *DU6* × *DUKs*

Die Mauslinien *DU6* und *DUKs* sind Auszuchtlinien. In der Kreuzung zwischen beiden Linien stammt die Linie *DU6* aus der Selektion auf hohe Körpermasse am 42. Lebensstag, die Linie *DUKs* ist die Kontrolllinie aus dem Selektionsexperiment. Beide Linien unterscheiden sich um das 2,2-fache in der Körpermasse, um das 1,7-fache im Proteingehalt und um das 3,2-fache im Fettgehalt. Die Imprintingeffekte wurden in einer F_2 -Nachkommenschaft getestet (Abb. 1).

Da beide Kreuzungspartner Auszuchtlinien sind, kann die Übertragung des paternalen und des maternalen Allels von den F_1 -Tieren auf die F_2 -Tiere zugeordnet werden. Im Ergebnis der Genomweiten Untersuchungen wurden signifikante ($p < 0,05$) Imprintingeffekte in der Nähe des Zentromers auf dem Chromosom 11 für das Lebergewicht und für das Milzgewicht gefunden (Abb. 2).

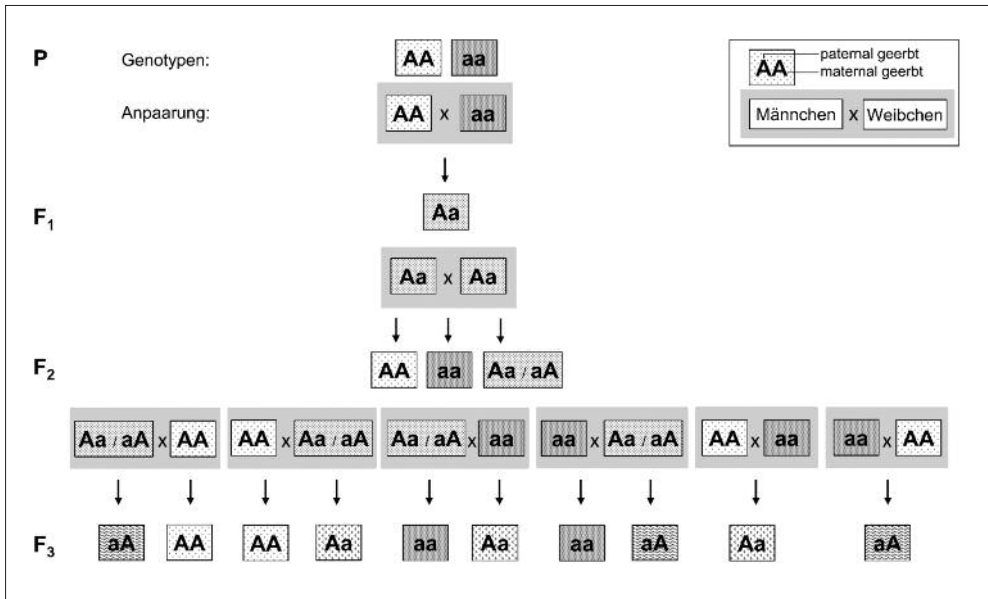


Abb. 1 Schematische Darstellung der Kreuzung zweier Inzuchtlinien. A und a sind alternative Allele. In der F₃-Generation werden vier Genotypen erwartet: AA, Aa, aA, und aa. Die Positionen bedeuten in dieser Darstellung, dass das erste Allel paternal und das zweite maternal übertragen worden ist. Aa/aA bedeutet, dass der Allelübertragungsweg unbekannt und beides möglich ist. In diesem Beispiel können erst in der F₃-Population paternale und maternale Übertragung differenziert, die Heterozygoten in zwei Klassen unterschieden und so *Parent-of-Origin*-Effekte untersucht und QTL für Imprinting lokalisiert werden.

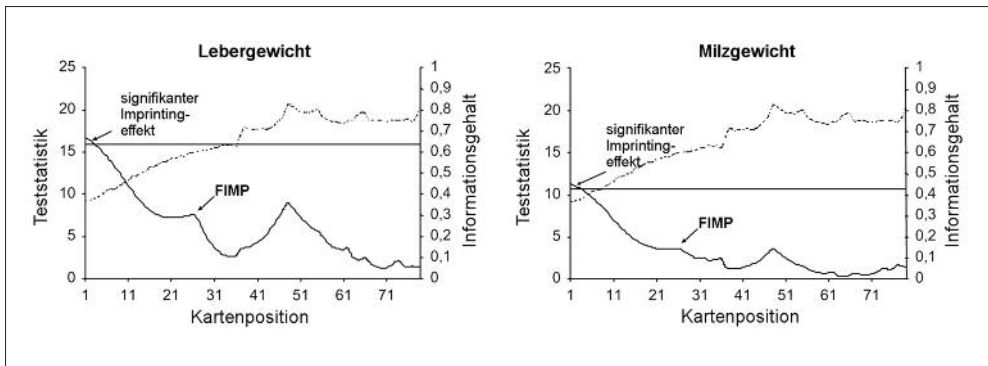


Abb. 2 F-Werte-Profil für einen *Parent-of-Origin*-Effekt (FIMP) auf Chromosom 11. Sowohl für Lebergewicht (*links*) als auch für Milzgewicht (*rechts*) konnten signifikante Imprintingeffekte nachgewiesen werden. Die durchgezogene Kurve zeigt das F-Werte-Profil über das gesamte Chromosom. Die horizontale Linie gibt die genomweite Signifikanzschwelle von $p = 0,05$ an. Darüber liegende F-Werte sind signifikant. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Informationsgehalt der Marker für den Test auf Imprinting (MANTEY et al. 2005).

Der Locus ist für beide Effekte paternal imprintet und maternal exprimiert. Das Allel aus der auf hohes Wachstum selektierten Linie DU6 führt bei paternalen Vererbung zu einer höheren Masse von Leber und Milz (Tab. 1).

Tab. 1 Durchschnittliche Abweichung der vier QTL-Genotypen vom Familienmittelwert an den genomischen Positionen mit signifikanten Imprintingeffekten (MANTEY et al. 2005)

Phänotypische Abweichung der Genotypen vom Familienmittelwert ^[2]							
Chromosom	Position (cM)	Merkmal ^[1]	$qq - a$	$qQ d - 0,5i$	$Qq d + 0,5i$	$QQ + a$	Imprintingmuster des Q Allels
11	1	LW (g)	-0,063	-0,134	0,106	0,063	Paternal stillgelegt
11	1	SW (g)	-0,004	-0,011	0,015	0,004	Paternal stillgelegt
14	25	BW (g)	-0,527	0,866	-1,760	0,527	Maternal stillgelegt
14	23	LW (g)	-0,052	0,076	-0,108	0,052	Maternal stillgelegt
14	32	KW (g)	-0,015	0,019	-0,025	0,015	Maternal stillgelegt
3	5	AFP (%)	0,071	0,076	-0,218	-0,071	Paternal stillgelegt
5	48	SW (g)	-0,005	0,009	-0,009	0,005	Maternal stillgelegt
X	30	LW (g)	0,014	0,311	-0,071	-0,014	Paternal stillgelegt

[1] AFP – abdominaler Fettprozentsatz; BW-Körpermasse; KW-Nierengewicht; LW-Lebergewicht; SW- Milzgewicht

[2] q und Q repräsentieren großelterliche Allele. q repräsentiert das DUKs-Allel, Q das DU6-Allele. Das erste Allel des Genotyps wurde paternal vererbt.

Weitere Imprintingeffekte für Leber- und Milzgewichte sowie für Körpermasse wurden auf dem Chromosom 14 gefunden. Diese Effekte sind maternal imprintet. Darüber hinaus wurden Imprintingeffekte für den abdominalen Fettgehalt auf Chromosom 3, für Milzgewicht auf Chromosom 5 und Lebergewicht auf Chromosom X nachgewiesen.

3.2 Imprintingeffekte auf Körpermasseentwicklung in der Kreuzung *DU6i*×*DBA/2J*

Die Linie *DU6i* ist eine Inzuchtlinie, die aus der oben genannten selektierten Auszuchtlinie *DU6* erzeugt wurde. Die Linie *DBA/2J* ist eine kommerzielle Inzuchtlinie, die als Kontrolle verwendet wurde. Beide Linien unterscheiden sich in der Körpermasse um das 3,7-fache, in der Muskelmasse um das 2,6-fache und in der abdominalen Fettmasse um das 7,5-fache. In der F_2 -Population, die zur Kartierung von additiven, dominanten und epistatischen Effekten verwendet wurde, sind quantitative Merkmalsloci (*Quantitative Trait Loci* – QTL) auf nahezu allen Chromosomen für das Wachstum, die Körperzusammensetzung und physiologische Merkmale wie Serumspiegel von Leptin, Insulin, IGF1 und IGFBP3 gefunden worden (BROCKMANN et al. 2000, 2001).

Die direkten additiven und dominanten Effekte erklärten etwa 30 % der phänotypischen Varianz in der F_2 -Population, und die epistatischen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen genomischen Loci trugen zur Aufklärung von weiteren 30 % der phänotypischen Varianz bei. Da die Effekte auf den einzelnen Chromosomen klein waren, wurden in einem nachfolgenden Experiment Chromosomen-Substitutionslinien erzeugt. Chromosomen-Substitutionslinien sind Mauslinien, die auf dem Hintergrund eines Rezipientenstammes jeweils ein Chromosom aus einer anderen Linie enthalten. Solche Linien werden durch Marker-gestützte Selektion während wiederholter Rückkreuzungen auf den Rezipientenstamm geschaffen (Abb. 3).

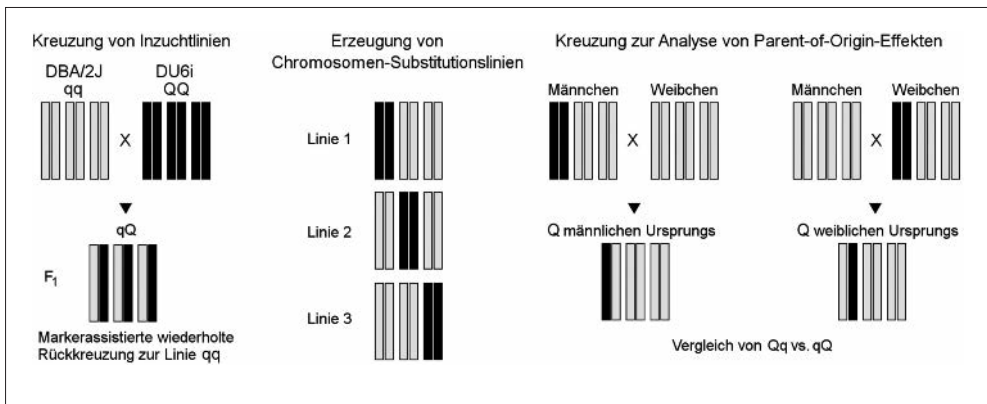


Abb. 3 Übertragung des Zielchromosoms (schwarz) während der Erzeugung von Chromosomen-Substitutionslinien. Da während der wiederholten Rückkreuzungen jeweils heterozygote DU6i-Chromosomenträger an homozygote DBA/2J-Rezipienten zurückgekreuzt werden, ist die Übertragung des DU6i-Chromosoms an die Nachkommen durch den Vater oder durch die Mutter eindeutig identifizierbar.

In unserem Fall wurden einzelne Chromosomen aus der auf hohes Wachstum selektierten und ingezüchteten Linie DU6i auf die Rezipientenlinie DBA/2J übertragen. Im Ergebnis wurden 19 Chromosomen-Substitutionslinien für jedes Autosom der Linie DU6i generiert. Während der Erzeugung dieser Chromosomen-Substitutionslinien wurden jeweils heterozygote Tiere, die eine Kopie des Zielchromosoms tragen, mit den homozygoten DBA/2J-Rezipiententieren verpaart. Da bekannt war, ob das heterozygote Tier als Vater oder Mutter angepaart wurde, kann in jedem Falle exakt verfolgt werden, ob das DU6i-Chromosom paternal oder maternal vererbt wurde. Dadurch können die beiden heterozygoten Genotypenklassen Aa und aA unterschieden werden, und es kann getestet werden, ob die beiden Genotypenklassen in der phänotypischen Merkmalsausprägung signifikant voneinander verschieden sind. Im Ergebnis wurden auf mehreren Chromosomen *Parent-of-Origin*-Effekte für die Körpermasse am 21., 42. und 63. Lebensstag nachgewiesen (Abb. 4). Besonders auffällig waren die Chromosomen 1, 2, 3, 9, 10, 11, 15, 16 und 17. Die Imprintingeffekte einzelner Chromosomen waren in verschiedenen Lebensaltern unterschiedlich hoch. Die Effekte auf den meisten Chromosomen waren im Alter von 6 Wochen am stärksten nachweisbar. Der größte und signifikanteste Effekt wurde auf Chromosom 11 gefunden. Der Effekt ist paternal imprintet (BEVOVA et al. 2006).

Auf dem Maus-Chromosom 11 wurden sowohl in der Kreuzung DU6×DUKs als auch in den Chromosomen-Substitutionslinien der Linie DU6i auf dem Hintergrund der Linie DBA/2J Imprintingeffekte nachgewiesen. Die zentromäre Region von Chromosom 11 ist dafür bekannt, dass sie ein Cluster von imprinteten Genen enthält. Chromosom 11 ist eins von 16 Mausechromosomen, für die wiederholt maternal und paternal ingeprintete Gene nachgewiesen wurden (WILLIAMSON et al. 2011). In der zentromären Region vom Chromosom 11 liegen die Gene *Ddc* (*Dopa decarboxylase*), *Meg1/Grb10* (*Growth factor receptor bound protein 10*), *Cobl* (*Cordon-bleu WH2 repeat, Repeat-protein*, interagiert mit Aktin-Zytoskelett, Dendritenentwicklung), *Zrsr1* (*Zinc finger, CCCH type, RNA binding motif and serine/arginine rich 1*) und *Commd1* (*COMM domain containing 1*), von denen *Ddc* und *Zrsr1* paternal und die anderen Gene maternal imprintet sind. Von zentraler Bedeutung sind das Gen *Meg1/Grb10*, das eine Imprinting-Kontrollregion enthält (SHIURA et al. 2009), und die beidseitigen benachbarten Gene *Cobl* und *Ddc*.

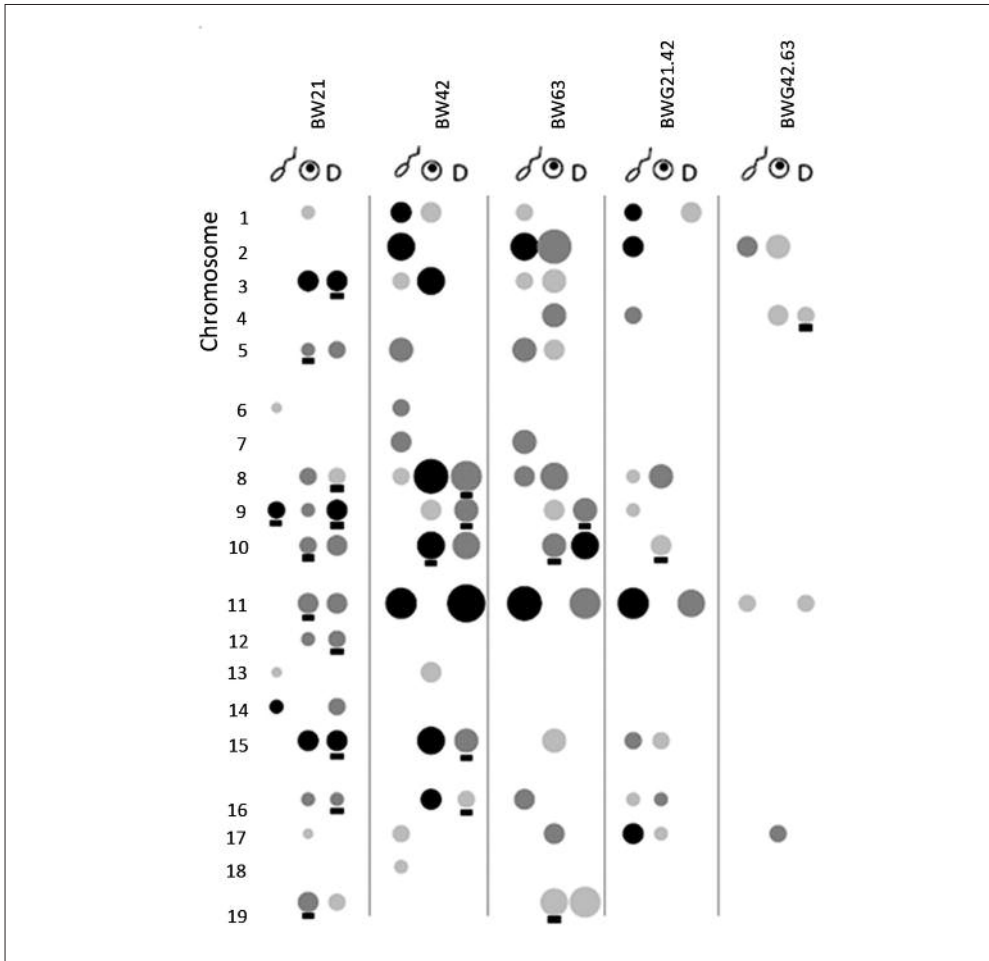


Abb. 4 Imprintingeffekte einzelner Chromosomen der Maus. Dargestellt sind die Signifikanz (Farbintensität) und die Größe (Durchmesser des Kreises) von Imprintingeffekten als Summeneffekt eines ganzen Chromosoms. Die Effekte wurden in einer Population von Mäusen untersucht, die für die Erzeugung von Chromosomen-Substitutionslinien genutzt wurden. Die Chromosomenzahlen auf der linken Seite geben die von der Linie DBA/2J durch die Linie DU6i substituierten Chromosomen an. Die Imprintingeffekte wurden für die Körpermasse am 21., 42. und 63. Lebensstag sowie für die Körpermassezunahme zwischen dem 21. und 42. sowie 42. und 63. Lebensstag untersucht. Das Spermien- und das Oozyten-Symbol repräsentieren paternale beziehungsweise maternale Effekte. D gibt an, ob der Unterschied zwischen paternalem und maternalem Effekt signifikant ist. Die Darstellung beruht auf den exakten Werten in BEVOVA et al. (2006).

Das maternale *Meg1/Grb10*-Allel enthält eine Imprinting-Kontrollregion, die methyliert ist, was dazu führt, dass ein langes Typ-I-Transkript gebildet wird. Gleichzeitig wird das *Cobl*-Allel exprimiert und die Expression von zwei verschiedenen Transkripten im *Ddc*-Gen reduziert. Im paternalen Allel fehlt die Methylierung im *Meg1/Grb10*-Locus, was zu einem kurzen Typ-II-Transkript führt. Gleichzeitig wird die Expression des *Cobl*-Gens unterdrückt und die Expression von *Ddc* verstärkt. Deletionsvarianten, in denen die Methylierungsstelle im

Meg1/Grb10 deletiert ist, zeigen das maternale Expressionsmuster in den benachbarten Genen Cobl und Ddc (SHIURA et al. 2009). Die Deletionsmutanten weisen ein reduziertes Wachstum der Embryonen auf, das bis zum adulten Tier erhalten bleibt.

3.3 Imprintingeffekte auf Muskelmerkmale in der Kreuzung BMMI806×BMMI816

Die Linien BMMI806 und BMMI816 sind Inzuchtlinien, die ausgehend von einem heterogenen Pool von Mäusen, die ursprünglich aus verschiedenen Zoohandlungen gekauft und anschließend auf hohe Muskelmasse selektiert wurden, entstanden sind. Die Linien unterscheiden sich signifikant im intramuskulären Fettgehalt und im Wasserbindevermögen der beiden Muskelgruppen *M. quadriceps* und *M. longissimus*. Die Kreuzungen wurden benutzt, um genomische Loci zu finden, die diese Muskelqualitätsmerkmale beeinflussen. Um die Chromosomenregionen auf möglichst wenige Gene zu reduzieren, die für einen genetischen Effekt verantwortlich sein können, wurden in diesem Experiment reziproke F₃-Populationen erzeugt (KÄRST et al. 2011). In der F₃-Population können die vier Genotypenklassen AA, Aa, aA und aa unterschieden werden. Alle Tiere wurden über das gesamte Genom mit genetischen Markern genotypisiert und im Alter von 10 Wochen hinsichtlich Körpermasse, Körperzusammensetzung und verschiedenen Muskelqualitätsmerkmalen phänotypisiert. Zu den Muskelmerkmalen, die untersucht wurden, zählen der intramuskuläre Fettgehalt, das Wasserbindevermögen sowie der pH-Wert nach 1 und 24 Stunden und der Glykogen- und Lactatgehalt im Muskel. Sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Tieren korrelierten das Wasserbindevermögen und der pH-Wert nach 24 Stunden sowie der Glykogengehalt stark ($0,22 < r < 0,37$, $p < 0,01$).

Diese Beziehung stimmt mit Beobachtungen am Muskel von landwirtschaftlichen Nutztieren überein. Mittels der Kopplungsanalysen wurden auf mehreren Chromosomen direkte Effekte für die untersuchten Phänotypen gefunden. Daneben waren Imprintingeffekte für Körpermasse auf Chromosom 12 und für das glykolytische Potenzial sowie den Glykogengehalt auf Chromosom 19 signifikant ($p < 0,01$) (Abb. 5). Obwohl auf Chromosom 12 das für den Callipyge-Phänotyp beim Schaf liegende Imprintingcluster Dlk1/Meg3 (*Delta-like 1 homolog, Maternally expressed 3*) liegt, befindet sich die neu identifizierte Imprintingregion in einer davon unabhängigen Region im proximalen Bereich des Chromosoms. Auch auf Chromosom 19 liegt die identifizierte Imprintingregion im proximalen Chromosomenbereich weit entfernt von den angenommenen bekannten Imprintinggenen Tbc1d12 (*TBC1 domain family, member 12*) und Ins1 (Insulin 1) am Telomerende (DESBUQUOIS et al. 2013). Das Muster der von uns identifizierten Imprintingeffekte entspricht einer bipolaren Expression. Die Imprintingeffekte auf Chromosom 12 und 19 erklären 4,6% bzw. 4,7% der phänotypischen Varianz in der F₃-Population. Der informative Haplotypenblock, der die Imprintingregion enthält, umfasst ca. 34 Mb auf Chromosom 12 und ca. 18 Mb auf Chromosom 19 (KÄRST et al. 2012).

In der Region auf Chromosom 12 hat man in Hirngewebe zwei Gene im Zusammenhang mit Imprinting in einem uniparentalen Expressionsmuster gefunden: Kidins220 (*Kinase D-interacting substrate 220*) und Pcnx14 (*Pecanex-like 4*) (GREGG et al. 2010).

In der Region auf Chromosom 19 sind mindestens fünf Gene bekannt, die paternal oder maternal imprintet sein können (GREGG et al., 2010). Das sind die Gene Ak3 (*Adenylate kinase 3*), C030046E11Rik (*RIKEN cDNA C030046E11 gene*), Atad1 (*ATPase family, AAA domain containing 1*), Ppp1r3c (*Protein phosphatase 1, regulatory [inhibitor] subunit 3C*), Btaf1 (*B-TFIID transcription factor-associated*) und Lgi1 (*Leucine-rich repeat LGI family, member 1*) (GREGG et al. 2010).

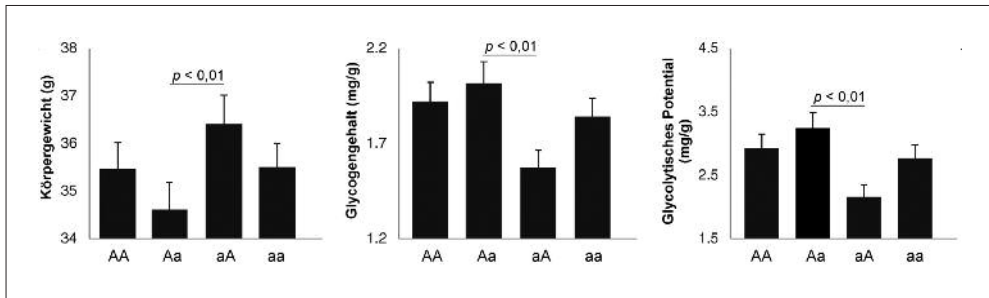


Abb. 5 Bipolare Imprintingmuster. Imprintingmuster der QTL für Körpergewicht auf Chromosom 12 und Glycogengehalt / Glycolytisches Potenzial auf Chromosom 19. Das Muster des Imprintingeffekts ist in diesen Fällen bipolar (KÄRST et al. 2012).

Die bipolare Expression ist eine von fünf möglichen phänotypischen genomischen Imprintingmustern (WOLF et al. 2008). Die bipolare Expression kann durch das Vorhandensein von zwei eng benachbarten Genen, die beide an der Merkmalsausprägung beteiligt sind, verursacht sein. Dabei könnte Gen 1 eine erhöhende und Gen 2 eine gleich große reduzierende Wirkung auf den Phänotyp haben, deren Summeneffekt Null ist. Dadurch unterscheiden sich die beiden homozygoten Klassen AA und aa phänotypisch nicht. Im Falle des paternalen Imprints von Gen 1 wird nur das Gen 2 exprimiert und ist dadurch in seiner Aktivität als Phänotyp in der Genotypenklasse aA sichtbar. Im Falle des maternalen Imprints wird Gen 2 inaktiviert, wodurch nur die Aktivität von Gen 1 sichtbar ist.

3.4 Imprintingeffekte auf Körperfettmasse in der Kreuzung BFMI860×C57BL/6NCrl

Die Linie BFMI860 ist eine von mehreren Inzuchtlinien, die aus einem heterogenen Pool von Tieren erzeugt wurde, die in verschiedenen Zoohandlungen gekauft und anschließend auf hohen Fettgehalt selektiert wurden, bevor sie ingezüchtet wurden. Die Linie C57BL/6NCrl (B6N) ist eine kommerzielle Inzuchtlinie. In komplexen reziproken Kreuzungen zwischen beiden Linien zur Erzeugung von F₁- und F₂-Populationen, die unter verschiedenen Ernährungsbedingungen gehalten wurden, sind über 1800 Tiere untersucht worden. Dabei wurde gefunden, dass sich die F₂-Tiere, die über 10 Wochen mit energiereicher Diät gefüttert wurden (45 % der Energie aus Fett), hinsichtlich der Abstammung vom Großvater signifikant in der Körpermasse und im Fettsatz unterscheiden. Wenn der Großvater aus der fetten Linie BFMI860 stammte, waren männliche F₂-Tiere im Alter von 10 Wochen schwerer und enthielten mehr Körperfett als männliche Tiere, die vom B6N-Großvater abstammten ($p < 0,05$). In der Tendenz waren auch weibliche Tiere schwerer und fatter, wenn sie vom BFMI860-Großvater abstammten, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (persönliche Daten, unveröffentlicht). Das führt zu der Hypothese, dass *Parent-of-Origin*-Effekte über mehrere Generationen erhalten bleiben und an die Nachkommen übertragen werden können. Dazu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Dank

Die Arbeiten wurden durch mehrere DFG-Projekte unterstützt.

Literatur

- BEVOVA, M. R., AULCHENKO, Y. S., AKSU, S., RENNE, U., and BROCKMANN, G. A.: Chromosome-wise dissection of the genome of the extremely big mouse line DU6i. *Genetics* 172, 401–410 (2006)
- BROCKMANN, G. A., HALEY, C. S., WOLF, E., KARLE, S., KRATZSCH, J., RENNE, U., SCHWERIN, M., und HOEFELICH, A.: Genome-wide search for loci controlling serum IGF binding protein levels of mice. *FASEB J.* 15, 978–987 (2001)
- BROCKMANN, G. A., KRATZSCH, J., HALEY, C. S., RENNE, U., SCHWERIN, M., and KARLE, S.: Single QTL effects, epistasis, and pleiotropy account for two-thirds of the phenotypic F(2) variance of growth and obesity in DU6i × DBA/2 mice. *Genome Res.* 10, 1941–1957 (2000)
- DESBUQUOIS, B., CARRE, N., and BURNOL, A. F.: Regulation of insulin and type 1 insulin-like growth factor signaling and action by the Grb10/14 and SH2B1/B2 adaptor proteins. *FEBS J.* 280, 794–816 (2013)
- GREGG, C., ZHANG, J., BUTLER, J. E., HAIG, D., and DULAC, C.: Sex-specific parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. *Science* 329, 682–685 (2010)
- KÄRST, S., CHENG, R., SCHMITT, A. O., YANG, H., VILLENA, F. P. DE, PALMER, A. A., and BROCKMANN, G. A.: Genetic determinants for intramuscular fat content and water-holding capacity in mice selected for high muscle mass. *Mamm. Genome* 22, 530–543 (2011)
- KÄRST, S., VAHDATI, A. R., BROCKMANN, G. A., and HAGER, R.: Genomic imprinting and genetic effects on muscle traits in mice. *BMC Genomics* 13, 408 (2012)
- MANTEY, C., BROCKMANN, G. A., KALM, E., and REINSCH, N.: Mapping and exclusion mapping of genomic imprinting effects in mouse F2 families. *J. Heredity* 96, 329–338 (2005)
- SHIURA, H., NAKAMURA, K., HIKICHI, T., HINO, T., ODA, K., SUZUKI-MIGISHIMA, R., KOHDA, T., KANEKO-ISHINO, T., and ISHINO, F.: Paternal deletion of Meg1/Grb10 DMR causes maternalization of the Meg1/Grb10 cluster in mouse proximal chromosome 11 leading to severe pre- and postnatal growth retardation. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1424–1438 (2009)
- WILLIAMSON, C. M., BALL, S. T., DAWSON, C., MEHTA, S., BEECHY, C. V., FRAY, M., TEBOUL, L., DEAR, T. N., KELSEY, G., and PETERS, J.: Uncoupling antisense-mediated silencing and DNA methylation in the imprinted Gnas cluster. *PLOS Genet.* 7, e1001347 (2011)
- WOLF, J. B., CHEVERUD, J. M., ROSEMAN, C., and HAGER, R.: Genome-wide analysis reveals a complex pattern of genomic imprinting in mice. *PLOS Genet.* 4, e1000091 (2008)

Prof. Dr. Gudrun A. BROCKMANN
Dr. Stefan KÄRST
Züchtungsbiologie und Molekulare Genetik
Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften
Humboldt-Universität zu Berlin
Invalidenstraße 42
10115 Berlin
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 30 20936089
Fax: +49 30 20936397
E-Mail: gudrun.brockmann@agrar.hu-berlin.de
stefan.kaerst@agrar.hu-berlin.de

Neue Einblicke in die embryonale Genomaktivierung durch Allel-spezifische Genexpressionsanalysen

Eckhard WOLF ML, kMA ÖAW,^{1,2} Alexander GRAF,¹ Stefan KREBS,¹
Valeri ZAKHARTCHENKO² und Helmut BLUM¹

Zusammenfassung

Während der frühen Embryonalentwicklung werden maternale RNAs und Proteine, die in der Eizelle gespeichert sind, graduell abgebaut, während die Transkription des embryonalen Genoms schrittweise aktiviert wird. Dieser Prozess wird in der englisch-sprachigen Literatur unter dem Begriff *Embryonic-to-Maternal Transition* (MET) zusammengefasst. Erste Einblicke in den zeitlichen Ablauf der embryonalen Genomaktivierung (EGA) konnten durch autoradiographische Analysen von Embryonen, die während der Kultur [³H]-Uridin aufgenommen und eingebaut hatten, gewonnen werden. Diese Studien zeigten, dass bei Rinderembryonen die Hauptwelle der embryonalen Genomaktivierung im 8- bis 16-Zell-Stadium erfolgt, transkriptionelle Aktivität jedoch auch schon im Einzell-Stadium nachzuweisen ist. Nachfolgende Studien verglichen die Transkriptomprofile von unbehandelten Embryonen mit denen von Embryonen, die mit dem Transkriptionsinhibitor α -Amanitin behandelt worden waren, um so Transkripte embryonalen Ursprungs zu identifizieren. Zudem wurden Kandidatengen-basierte sowie holistische Genexpressionsuntersuchungen an verschiedenen Stadien der präimplantativen Embryonalentwicklung durchgeführt und stadienspezifisch charakteristische Transkriptomprofile identifiziert. Allerdings konnte in diesen Studien der Beginn der embryonalen Transkription nur für solche Gene nachgewiesen werden, die nicht in Eizellen exprimiert werden, da anderenfalls nicht zwischen bereits vorhandenen maternalen und neu entstandenen embryonalen Transkripten unterschieden werden konnte. Mittels RNA-Sequenzierung haben wir holistische Transkriptomanalysen an bovinen Eizellen im Germinalvesikel- bzw. im Metaphase-II-Stadium sowie an Embryonen im 4-Zell-, 8-Zell-, 16-Zell- und Blastozysten-Stadium durchgeführt und den bislang umfangreichsten Transkriptomdatensatz für die Eizell- und frühe Embryonalentwicklung beim Rind erstellt. Dabei wurde der Ablauf der EGA mittels verschiedener Strategien untersucht: (a) durch den Nachweis von embryonalen Transkripten, die nicht in Eizellen vorkommen; (b) durch den Nachweis von Transkripten der väterlichen Allele; und (c) durch das Auftreten von ungeriffenen Transkripten, die Intronsequenzen enthalten. Mit diesen drei Ansätzen konnten wir für fast 7400 Gene den Beginn der embryonalen Expression bestimmen. Damit steht eine neue Informationsebene für zukünftige Untersuchungen zu Störungen der frühen Embryonalentwicklung durch genetische, epigenetische und Umweltfaktoren zur Verfügung.

Abstract

Maternal-to-embryonic transition (MET) is the period in early embryonic development when maternal RNAs and proteins stored in the oocyte are gradually degraded and transcription of the embryonic genome is activated. First insights into the timing of embryonic genome activation (EGA) came from autoradiographic analyses of embryos following incorporation of [³H]-uridine in culture. First low transcriptional activity was detected in one-cell embryos, followed by major EGA of bovine embryos at the 8- to 16-cell stage. Subsequent studies revealed active transcription in embryos by comparing transcriptome profiles of untreated control embryos with those of embryos cultured in the presence of the transcription inhibitor α -amanitin. In addition, candidate gene-based and global gene expression studies over several stages of early development were performed and characteristic stage-specific transcriptome profiles were revealed. However, the onset of embryonic transcription was obscured by the presence of maternal transcripts and could only be determined for genes which are not expressed in oocytes. Using RNA sequencing of bovine germinal

1 Laboratorium für funktionale Genomanalyse (LAFUGA).

2 Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München.

vesicle and metaphase II oocytes, and of 4-cell, 8-cell, 16-cell and blastocyst stage embryos, we established the most comprehensive transcriptome data set of bovine oocyte maturation and early development. EGA was analyzed by (a) detection of embryonic transcripts which are not present in oocytes; (b) detection of transcripts from the paternal alleles; and (c) detection of primary transcripts with intronic sequences. Using these approaches we were able to map the onset of embryonic transcription for almost 7,400 genes, providing a new layer of information for detecting disturbances of early development due to genetic, epigenetic, and environmental factors.

1. Einleitung

Die frühe Embryonalentwicklung wird durch maternale Transkripte und Proteine gesteuert, die während der Entwicklung der Eizelle gebildet und gespeichert werden (Übersicht in TADROS und LIPSHITZ 2009). Im Modellorganismus Maus wurde eine Reihe sogenannter *Maternal-effect*-Gene entdeckt, die während der Oogenese exprimiert werden. Die Produkte dieser Gene sind an der Prozessierung des paternalen Genoms nach der Befruchtung, der Degradation maternaler RNAs und Proteine sowie an der in die Aktivierung des embryonalen Genoms beteiligt (Übersicht in LI et al. 2010). Während der weiteren Entwicklung geht die Kontrolle von maternalen auf embryonale Transkripte und Proteine über. Für diesen entscheidenden Prozess der frühen Entwicklung wurde in der englischsprachigen Literatur der Begriff *Maternal-to-Embryonic Transition* (MET) geprägt. Dabei spielen in der Eizelle gespeicherte Faktoren, welche die Chromatinstruktur beeinflussen, eine essentielle Rolle (OSTRUP et al. 2013). Epigenetische Modifikationen der DNA und der Histonproteine in frühen Embryonen (DEAN et al. 2001, SANTOS et al. 2003, LEPIKHOV et al. 2008, WOSSIDLO et al. 2011) beeinflussen die Aktivierung der embryonalen Genexpression.

Auch wenn allgemein angenommen wird, dass die Mechanismen der embryonalen Genomaktivierung (*Embryonic Genome Activation* – EGA) bei den Säugern konserviert sind, zeigen sich doch Unterschiede im zeitlichen Ablauf. So erfolgt die Hauptwelle der EGA (Major-EGA) bei der Maus im 2-Zell-Stadium (Übersicht in SIRARD 2012), bei Mensch (BRAUDE et al. 1988) und Schwein im 4- bis 8-Zell-Stadium (Übersicht in SIRARD 2012) sowie bei Rind und Kaninchen im 8- bis 16-Zell-Stadium (SIRARD 2012, TELFORD et al. 1990). Der Hauptwelle der embryonalen Genomaktivierung geht eine sogenannte Minor-EGA voraus. Genexpressionsstudien während der präimplantativen Embryonalentwicklung bei der Maus zeigten drei aufeinanderfolgende, überlappende Wellen der embryonalen Genomaktivierung: die Minor-EGA im Einzell-Stadium, die Major-EGA im 2- bis 4-Zell-Stadium und eine sogenannte „mid-preimplantation“-EGA im 4- bis 8-Zell-Stadium. Nachfolgende Wellen der Genexpression waren mit der Kompaktierung der Morula sowie der Kavitation der Blastozyste assoziiert (Übersicht in WANG und DEY 2006). Gene, die für die Zellproliferation, die Regulation der Transkription sowie für den DNA- und Proteinmetabolismus eine Rolle spielen, wurden in der frühen Phase der Embryonalentwicklung exprimiert (KANKA et al. 2012). Auch wenn die spezifischen Mechanismen der Initiation der embryonalen Genomaktivierung nicht vollständig geklärt sind, sind einige wichtige Faktoren bekannt. Dazu gehören beispielsweise maternales Cyclin A2 (CCNA2), Retinoblastoma-Protein (RB1), die katalytische Untereinheit des *SWI/SNF related chromatin remodeling complex* (BRG1) und *sex determining region Y-box2* (SOX2), wie kürzlich in einem Modell der EGA bei der Maus gezeigt wurde (KANKA et al. 2012).

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass in Rinderembryonen die Major-EGA im 8- bis 16-Zell-Stadium stattfindet. Die ersten Hinweise kamen aus Studien, in denen autoradiographisch der Einbau von [³H]-Uridin in frühe Rinderembryonen untersucht wurde (CAMOUS

et al. 1986, FREI et al. 1989). In diesem Stadium konnten auch größere Veränderungen der Struktur der Nukleoli in den embryonalen Zellen beobachtet werden. Die sogenannten *Nucleolus Precursor Bodies* (NPBs), elektronendichte sphärische Massen von dicht gepackten Fibrillen, entwickelten sich in einen fibrillo-granulären Nukleolus mit primären exzentrischen und sekundären peripheren Vakuolen (Übersicht in SVARCOVA et al. 2007). Nach längerer [³H]-Uridin-Exposition von Rinderembryonen konnte transkriptionelle Aktivität jedoch bereits im 2- bis 4-Zell-Stadium (VIUFF et al. 1996, HYTTEL et al. 1996, MEMILI et al. 1998) bzw. sogar im Einzell-Stadium nachgewiesen werden (MEMILI and FIRST 1999). Die Transkription von ribosomaler RNA wurde erstmals in 4-Zell-Embryonen vom Rind durch eine Kombination von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und Silberfärbung nachgewiesen (VIUFF et al. 1998).

Nachfolgende Studien zur Charakterisierung der Genomaktivierung in Rinderembryonen nutzten experimentelle Ansätze, in denen die Embryonen in Abwesenheit oder Anwesenheit des Transkriptioninhibitors α -Amanitin kultiviert und anschließend mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) oder Array-basierten Verfahren hinsichtlich ihres Transkriptionsprofils untersucht wurden.

2. Einblicke in die embryonale Genomaktivierung durch RT-PCR und Microarray-Studien

Zur detaillierten Untersuchung des Beginns der embryonalen Genomaktivierung wurden Rinderembryonen vom Einzell-Stadium bis zum Stadium der expandierten bzw. geschlüpften Blastozyste für 4–12 h in Abwesenheit oder Anwesenheit von α -Amanitin kultiviert. Anschließend wurden stadienspezifische α -Amanitin-abhängige Transkripte mittels *differential display* (DD)-RT-PCR erfasst (NATALE et al. 2000). Allerdings konnten damals nur wenige der differenziellen PCR-Banden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu humanen *copy DNA* (cDNA)-Sequenzen identifiziert werden.

Eine weitere Studie nutzte *Affymetrix Bovine Midi euk2v3 Genome Arrays*, um die Transkriptomprofile boviner 8-Zell-Embryonen, die ohne oder mit α -Amanitin kultiviert worden waren, zu erfassen (MISIRLIOGLU et al. 2006). Von den 24072 Probensets auf diesem Array zeigten 1490 bei den unbehandelten Embryonen ein signifikant stärkeres Hybridisierungssignal als bei den α -Amanitin-behandelten Embryonen. Von den signifikanten Probensets waren 233 spezifisch für Gene, die überwiegend den *Gene Ontology* (GO)-Klassen „Regulation der Transkription“, „Zelladhäsion“, „Apoptose/Zelltod“, „Proteinfaltung“, „Transport“, „Metabolismus“ und „Immunantwort“ zuzuordnen waren (MISIRLIOGLU et al. 2006).

Andere Ansätze zur Charakterisierung der Genomaktivierung in Rinderembryonen basierten auf vergleichenden Genexpressionsuntersuchungen verschiedener Entwicklungsstadien. In einer Studie von VALLÉE und Mitarbeitern (VALLÉE et al. 2009) wurden die Transkriptomprofile von Eizellen im Germinalvesikel-Stadium sowie von *ex vivo* gewonnenen Embryonen im 2-Zell-, 8-Zell- und Blastozysten-Stadium mit einem cDNA-Microarray (1153 cDNAs) auf der Basis von vier verschiedenen subtraktiven cDNA-Banken aus Eizellen und frühen Embryonalstadien verglichen. In einem paarweisen Vergleich aller untersuchten Entwicklungsstadien wurden die größten Unterschiede im Genexpressionsprofil zwischen Eizellen und Blastozysten gefunden. Der größte Teil der differenziell exprimierten Gene ließ sich – abhängig von der stadienspezifischen Änderung der Transkriptabundanz – drei Clustern zuordnen: (a) Gene mit der höchsten Transkriptabundanz in Eizellen und einer niedrigeren Tran-

skriptabundanz in allen untersuchten Embryonalstadien (72 % der differenziell exprimierten Gene); (b) Gene mit einem Expressionsprofil wie in Cluster (a), aber mit einer weiter verminderten Transkriptabundanz in Blastozysten (17 % der differenziell exprimierten Gene); und (c) Gene mit einem Expressionsprofil wie in Cluster (a), aber mit einer vermehrten Transkriptabundanz in Blastozysten (10 % der differenziell exprimierten Gene). Die Autoren schlussfolgerten, dass die ersten beiden Cluster vor allem maternale Transkripte beinhalten, während der dritte Cluster die embryonale Genomaktivierung repräsentiert (VALLÉE et al. 2009). Allerdings wurde in dieser Studie aufgrund des Microarray-Designs nur ein kleiner Teil der tatsächlich während der frühen Entwicklung von Rinderembryonen exprimierten Gene erfasst.

Um dieses Problem zu umgehen, verwendete eine andere Studie zur Charakterisierung der Genexpression während der frühen Entwicklung von Rinderembryonen *Affymetrix GeneChip Bovine Genome Arrays* mit Probensets für 23000 Transkripte (KUES et al. 2008). Die Zahlen der unterschiedlich abundanten Transkripte in den untersuchten Stadien (Metaphase-II-Eizelle, Zygote, 2-Zell-Embryo, 4-Zell-Embryo, 8-Zell-Embryo, Morula, Blastozyste) lagen zwischen $12,0$ und $14,4 \times 10^3$. In einem paarweisen Vergleich der Profile aufeinanderfolgender Entwicklungsstadien wurde die größte Zahl differenziell exprimierter Gene zwischen dem 8-Zell- und dem 4-Zell-Stadium gefunden. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Hauptwelle der embryonalen Genomaktivierung im 8-Zell-Stadium. Allerdings konnte diese Studie nicht zwischen maternalen Transkripten aus der Eizelle und *De-novo*-Transkripten, die durch den Embryo synthetisiert wurden, unterscheiden. Gleiches gilt für eine Vielzahl von Studien, die entwicklungsabhängige Expressionsprofile von Kandidatengenen mittels semiquantitativer oder quantitativer RT-PCR analysierten (Übersicht in WRENYCZKI et al. 2005). Eine Aussage zur embryonalen Aktivierung eines Gens war nur möglich, wenn in den Eizellen keine Transkripte dieses Gens nachweisbar waren.

3. RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) zur Untersuchung der frühen Entwicklung von Rinderembryonen

Im Vergleich zu Technologien, die auf Hybridisierung basieren und nur relative Transkriptabundanzen bestimmen, hat RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) eine Reihe von Vorteilen (Übersicht in WANG et al. 2009). RNA-Seq erlaubt die direkte Bestimmung von cDNA-Sequenzen aus Millionen von kurzen Fragmenten und somit Transkriptomanalysen mit der Auflösung einzelner Nukleotide. Dies führt im Vergleich zu hybridisierungsbasierten Techniken zu einer höheren Sensitivität, einem höheren dynamischen Bereich und weniger Problemen mit unspezifischen Hybridisierungen bei Arrays (WANG et al. 2009). Ein besonders wichtiger Vorteil ist, dass RNA-Seq die Unterscheidung von maternalen und paternalen Transkripten auf der Basis von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms* = SNPs) und anderen genetischen Markern ermöglicht.

Wir haben eine RNA-Seq-Studie von bovinen Eizellen im GV- und im MII-Stadium sowie von *in vitro* produzierten Rinderembryonen im 4-Zell-, 8-Zell-, 16-Zell- und Blastozysten-Stadium durchgeführt (GRAF et al. 2014b). Die Embryonen wurden durch *In-vitro*-Befruchtung von Eizellen der Rasse Deutsches Fleckvieh (*Bos taurus taurus*) mit Spermien eines einzigen Bullen der genetisch entfernten Rasse Brahman (*Bos taurus indicus*) erzeugt. Durch diese genetische Distanz sollte eine große Zahl von SNPs für die Identifizierung der elterlichen Herkunft der Transkripte zur Verfügung stehen. Zudem wurden die RNA-Seq-Bibliotheken ohne

polyA⁺-Selektion hergestellt. Dadurch werden neben reifen mRNAs auch *de novo* synthetisierte, nicht vollständig gereifte mRNA-Spezies erfasst, die noch Intronsequenzen enthalten (AMEUR et al. 2011). Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen den überwiegend vollständig gespleißten maternalen Transkripten aus der Eizelle und den aktiv transkribierten embryonalen RNA-Spezies (GRAF et al. 2014b). In den untersuchten Entwicklungsstadien wurden Transkripte von 12,4 bis 13,7 × 10³ unterschiedlichen Genen detektiert, was sich gut mit den Ergebnissen einer früheren Microarray-Studie (KUES et al. 2008) deckt. In unserer Studie waren zwischen Eizellen im GV- bzw. MII-Stadium sowie zwischen MII-Eizellen und 4-Zell-Embryonen nur vergleichsweise wenige differenziell abundante Transkripte zu finden. Ein starker Anstieg der Zahl differenziell exprimierter Gene war jedoch zwischen dem 8-Zell- und dem 4-Zell-Stadium sowie auch zwischen späteren Stadien zu verzeichnen, was für eine Hauptwelle der embryonalen Genomaktivierung im 8-Zell-Stadium spricht. Der Anteil differenziell exprimierter Gene mit verminderter Abundanz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien war in der frühen Entwicklung gering (17 % zwischen 4-Zell-Embryo und MII-Eizelle), stieg jedoch auf 55 % zwischen 16-Zell- und 8-Zell-Embryonen an. Dies kann als Hinweis auf die Degradation maternaler Transkripte interpretiert werden (Abb. 1).

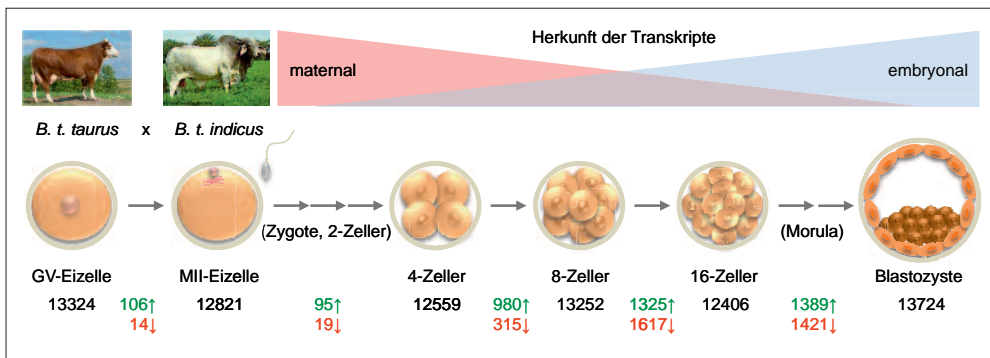


Abb. 1 Modell zur Analyse der Genomaktivierung in Rinderembryonen mittels RNA-Seq. Analysiert wurden Eizellen im Germinalvesikel (GV)- und Metaphase II (MII)-Stadium sowie Embryonen im 4-Zell-, 8-Zell-, 16-Zell- und Blastozysten-Stadium. Die Embryonen wurden durch *In-vitro*-Befruchtung von Eizellen der Rasse Deutsches Fleckvieh (*Bos taurus taurus*) mit Spermien eines Bullen der Rasse Brahman (*Bos taurus indicus*) erzeugt. Die Zahlen der in den jeweiligen Stadien nachweisbaren Transkripte von verschiedenen Genen sind in schwarz angegeben. Die Zahlen der zwischen aufeinander folgenden Stadien differenziell abundanten Transkripte sind farbig angegeben (grün = vermehrte Abundanz, rot = verminderter Abundanz der Transkripte im nachfolgenden gegenüber dem vorherigen Stadium) (GRAF et al. 2014b).

4. Strategien zur Charakterisierung der embryonalen Genomaktivierung mittels RNA-Sequenzierung

In unserer Studie wurden drei verschiedene Strategien zur Charakterisierung der embryonalen Genomaktivierung verwendet (GRAF et al. 2014b): (a) der Nachweis von embryonalen Transkripten, die nicht in Eizellen nachweisbar waren, (b) der Nachweis von paternalen Transkripten auf der Basis spezifischer SNPs und (c) der Nachweis unvollständig gespleißter Transkripte als Beleg einer *De-novo*-Transkription.

Der erste Untersuchungsansatz ist dadurch limitiert, dass sowohl in Eizellen als auch in frühen embryonalen Stadien eine große Zahl von RNA-Spezies vorhanden ist. Zudem sind

die Transkriptomprofile aller untersuchten Entwicklungsstadien sehr ähnlich. So konnten wir mit diesem Ansatz nur für eine vergleichsweise geringe Zahl von Genen den Beginn der embryonalen Expression bestimmen: für 8 Gene im 4-Zell-Stadium, 129 Gene im 8-Zell-Stadium, 36 Gene im 16-Zell-Stadium sowie 47 Gene im Blastozysten-Stadium.

Das Kreuzungsschema (*Bos t. taurus* × *Bos t. indicus*), das zur Herstellung der Embryonen für unsere Studie verwendet wurde, ermöglicht einen detaillierten Einblick in die Genomaktivierung über das Auftauchen von Transkripten mit paternalen SNPs. Dafür wurden paternale (Brahman-spezifische) SNPs genomweit identifiziert und SNPs in den kodierenden Regionen der Gene in die Analyse einbezogen. Ein SNP wurde als paternal erachtet, wenn er weder in Eizellen von *Bos t. taurus*, noch in *Bos t. taurus* × *Bos t. taurus*-Kreuzungsembryonen (Jersey × Deutsches Fleckvieh) gefunden wurde. Auf der Basis dieser Kriterien konnten für rund ein Fünftel der etwa 20000 bekannten bovinen Gene paternale SNPs nachgewiesen und für die Untersuchung der embryonalen Genomaktivierung genutzt werden. Anhand dieser Daten erfolgte die Aktivierung von 16 Genen im 4-Zell-Stadium, von 395 Genen im 8-Zell-Stadium, von 314 Genen im 16-Zell-Stadium sowie von 212 Genen im Blastozysten-Stadium.

Weitaus effizienter für die Untersuchung der embryonalen Genaktivierung erwies sich jedoch die Erfassung von Intronsequenzen als Beweis für *de novo* transkribierte, unvollständig gespleißte prä-mRNAs. Dieser Ansatz ermöglichte den Nachweis der embryonalen Aktivierung für eine große Zahl von Genen: für 390 Gene im 4-Zell-Stadium, für 3965 Gene im 8-Zell-Stadium, für 628 Gene im 16-Zell-Stadium und für 1865 Gene im Blastozysten-Stadium. Der starke Anstieg von Primärtranskripten im 8-Zell-Stadium deckt sich mit der Major-EGA beim Rind in diesem Stadium. Interessanterweise nahm der intronische Anteil für längere Gene vom 8-Zell- bis zum Blastozysten-Stadium weiter zu (GRAF et al. 2014b). Eine Ursache könnte sein, dass sehr große Gene während der kurzen Zellzyklen in der frühen Embryonalentwicklung nicht vollständig transkribiert werden können (SWINBURNE und SILVER 2008). Alternativ könnte ein weniger effizientes Spleißen von langen Transkripten für den erhöhten Anteil intronischer Sequenzen nach dem 8-Zell-Stadium verantwortlich sein.

5. Funktionsklassen der während der frühen Embryonalentwicklung aktivierten Gene

In einer funktionellen Klassifizierung der 414 Gene, die im 4-Zell-Stadium aktiviert wurden, waren die *Gene-ontology* (GO)-Kategorien „RNA-Prozessierung“, „Translation“ und „Transport“ am stärksten vertreten (Abb. 2) (GRAF et al. 2014b). Unter den früh aktivierten Genen befand sich *HNRNPA2B1* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1*), dessen Produkt mit dem Pluripotenz-Transkriptionsfaktor SOX2 interagiert (FANG et al. 2011). Ein weiteres früh aktiviertes Gen ist *KLF17*, das den Transkriptionsaktivator *Krüppel-like factor 17* kodiert (VAN VLIET et al. 2006). Das mit Pluripotenz assoziierte Gen *KLF17* wurde während des Übergangs von Epiblast-Zellen humaner Blastozysten in primäre embryonale Stammzellen (ES-Zellen) als herunterreguliert gefunden (YAN et al. 2013). Obwohl entsprechende Transkripte bereits in Eizellen vorhanden waren, konnte die embryonale Aktivierung im 4-Zell-Stadium auch für die Gene *H2AFZ* (*H2A histone family, member Z*), *EPCAM* (*epithelial cell adhesion molecule*), *MLL2* (*histone-lysine N-methyltransferase*) und *YES1* (*Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1*) durch den Nachweis von unreifen, intronhaltigen Primärtranskripten erfasst werden. Die Histon-Variante H2AFZ beeinflusst die Chromatinstruktur, fördert die Expression von Pluripotenz-Genen und ist allgemein an der Regulation der Genexpression, Chro-

mosomen-Segregation und X-Chromosom-Inaktivierung beteiligt. Eine homozygote Inaktivierung von *H2afz* in Mausembryonen führte zu einer gestörten Entwicklung der Inneren Zellmasse und zu früher embryonaler Letalität (FAAST et al. 2001). *Knockdown*-Experimente von *H2afz* in murinen ES-Zellen zeigten, dass H2AFZ sowohl für die Selbsterneuerung als auch für die Differenzierung erforderlich ist (HU et al. 2013). Die genetische Inaktivierung von *Epcam* im Mausmodell führte zu einer verzögerten Embryonalentwicklung, prominenten Veränderungen der Plazenta sowie zu einem Absterben der Embryonen um den Entwicklungstag 12,5 (NAGAO et al. 2009). Diese Befunde sprechen gegen eine essenzielle Rolle dieses Gens während der präimplantativen Embryonalentwicklung. Allerdings zeigten *Knockdown*-Experimente in murinen ES-Zellen, dass EPCAM für deren Selbsterneuerung notwendig ist (GONZALEZ et al. 2009). Die Histon-Lysin-N-Methyltransferase MLL2 reguliert die Transkription über Histon-Modifikationen und ist entscheidend für die frühe Embryonalentwicklung. *Mll2*^{-/-}-Mausembryonen zeigen ab dem Embryonaltag 6,5 Wachstums- und Entwicklungsverzögerungen und starben vor dem Entwicklungstag 11,5 (GLASER et al. 2006). Konditionale *Mll2-Knockout*-Experimente im Mausmodell zeigten jedoch, dass MLL2 nach dem Embryonaltag 11,5 nicht mehr für die Entwicklung essenziell ist (GLASER et al. 2009). Während die Inaktivierung des *Yes1*-Gens in der Maus keine offensichtlichen phänotypischen Konsequenzen hatte (STEIN et al. 1994), spielt YES1 für die Selbsterneuerung von ES-Zellen sowie als Regulator der Pluripotenz-Gene *Pou5f1/Oct4* und *Nanog* eine Rolle (TAMM et al. 2011).

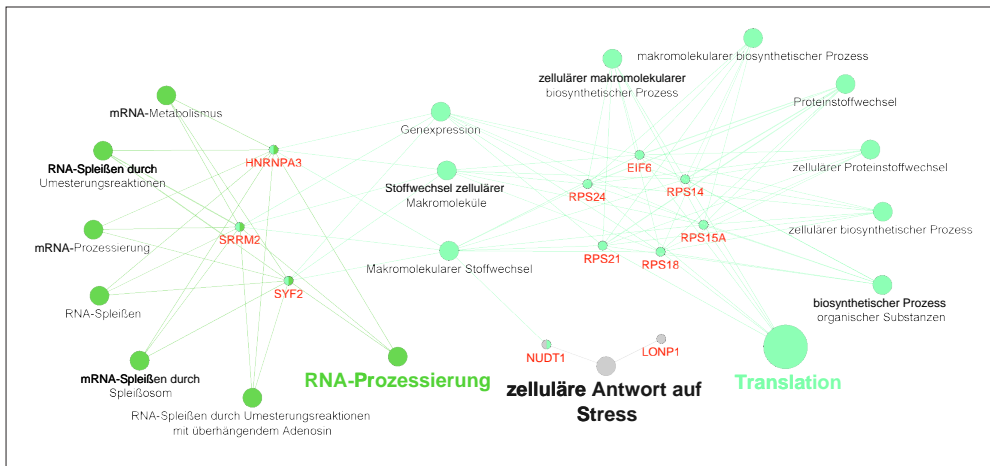


Abb. 2 Funktionsontologien der Gene, die im 4-Zell-Stadium von Rinderembryonen aktiviert werden (GRAF et al. 2014b).

Während der Zeitpunkt der Major-EGA in 8-Zell-Embryonen beim Rind bereits bekannt war, konnten wir in unserer Studie die Aktivierung von 4489 spezifischen Genen in diesem Embryonalstadium erfassen. In einer GO-Klassifizierung dieser Gene waren die Kategorien „DNA-abhängige Transkription“, „Purin-Nukleotid-Metabolismus“, „Protein-Ubiquitinierung“, „Initiation der Translation“ und vor allem „RNA-Metabolismus“ am stärksten überrepräsentiert (Abb. 3). Diese Funktionsgruppen von Genen spiegeln den Beginn von Transkription und Translation zum Zeitpunkt der Major-EGA sowie die Degradation maternaler Transkripte und Proteine zu diesem Zeitpunkt wider.

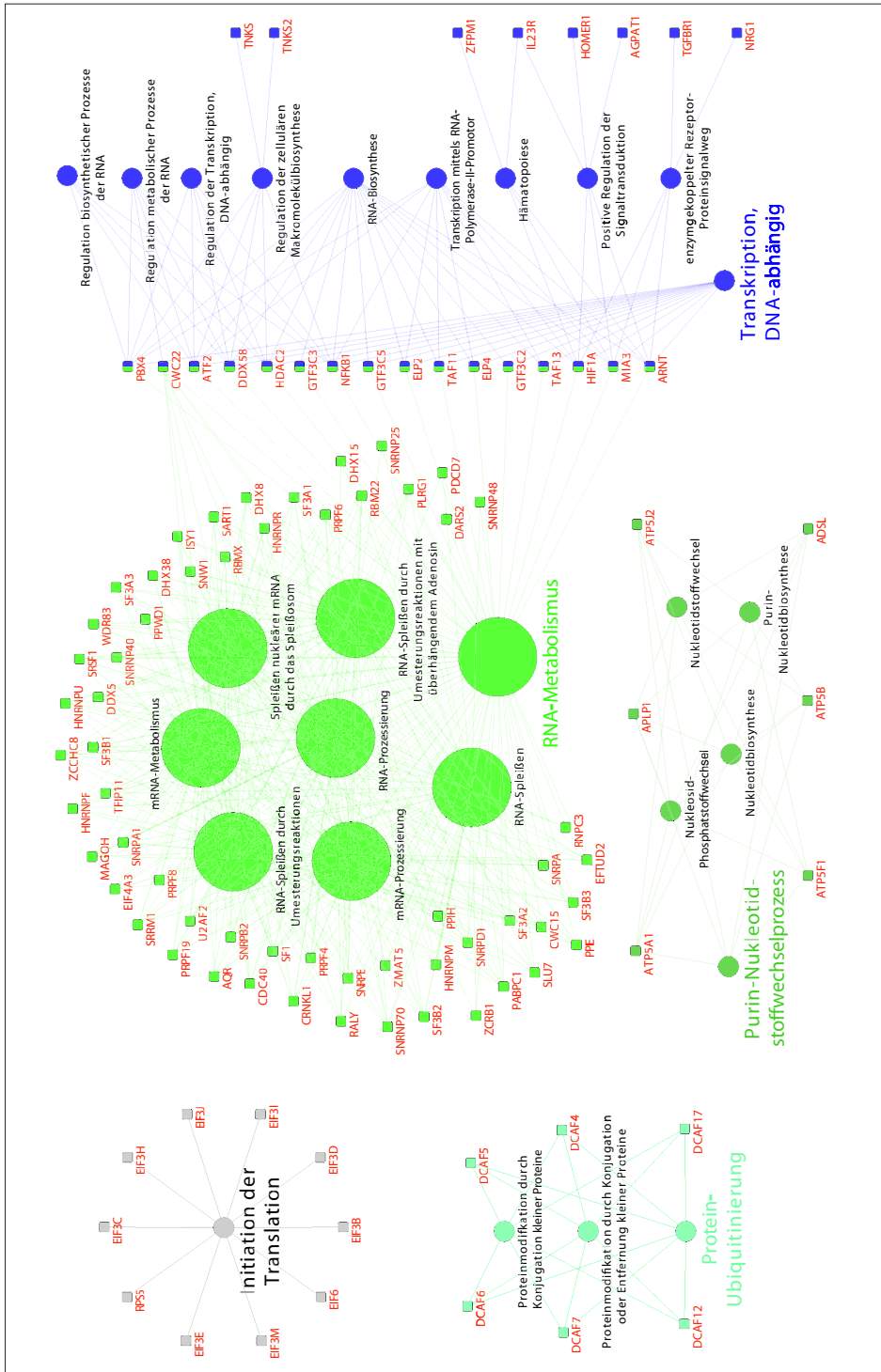


Abb. 3 Funktionsontogenen der Gene, die im 8-Zell-Stadium von Rinderembryonen aktiviert werden (GRAF et al. 2014a).

Unter der großen Zahl von Genen, die im 8-Zell-Stadium aktiviert wurden, fanden sich Gene, die für die Erhaltung pluripotenter Zellen in frühen Embryonalstadien bzw. in ES-Zellen relevant sind. Ein Beispiel ist *SALL4* (*sal-like 4 [Drosophila]*). Im Maus-Modell wurde gezeigt, dass *SALL4* wichtig für die Regulation der *Pou5f1/Oct4*-Expression und die Erhaltung der Pluripotenz in der Inneren Zellmasse von Blastozysten ist (ZHANG et al. 2006). Das Proto-Onkogen *MYC* wurde ebenfalls im 8-Zell-Rinderembryo aktiviert. Eine kürzlich publizierte Studie von Mausembryonen zeigte, dass die *MYC*-Konzentrationen in Epiblast-Zellen heterogen sind und dass eine Selektion von Epiblast-Zellen stattfindet, indem Zellen mit niedriger *MYC*-Expression eliminiert werden (CLAVERIA et al. 2013). Weitere im 8-Zell-Rinderembryo aktivierte Gene sind *TBX3* (*T-box 3*) und *KLF4* (*Krüppel-like factor 4*). Bei der Maus wurden niedrige Konzentrationen von *Tbx3*-Transkripten in MII-Eizellen sowie in 2-Zell- und 4-Zell-Embryonen, höhere Konzentrationen in 8-Zell-Embryonen und Morulae, die höchsten Konzentrationen aber in Blastozysten gefunden (GUO et al. 2010). Der Transkriptionsfaktor *TBX3* ist für die Selbsterneuerung von murinen embryonalen Stammzellen sowie für deren Differenzierung in extraembryonales Endoderm essentiell (LU et al. 2011). *KLF4* verhindert die Differenzierung von murinen ES-Zellen und reguliert die Expression von *Nanog* (ZHANG et al. 2010). Allerdings scheint *KLF4* nicht für die frühe Embryonalentwicklung essentiell zu sein, da sich *Klf4*^{-/-}-Mausembryonen bis zur Geburt entwickeln. Danach sterben sie allerdings aufgrund von Hautdefekten und den dadurch verursachten Flüssigkeitsverlusten (KATZ et al. 2002). Während *SALL4*-, *MYC*-, *TBX3*- und *KLF4*-Transkripte bereits in bovinen Eizellen vorhanden waren, wurde *NANOG* (*Nanog-Homeobox*)-mRNA – im Einklang mit einem früheren Bericht (KHAN et al. 2012) – zum ersten Mal in 8-Zell-Embryonen nachgewiesen. *NANOG* ist essentiell für die frühe Embryonalentwicklung, da Mausembryonen mit einem homozygoten Defekt des *Nanog*-Gens eine gestörte Entwicklung der embryonalen und extraembryonalen Gewebe zeigen und zwischen Embryonaltag 3,5 und 5,5 absterben (MITSUI et al. 2003). Depletionsexperimente von *POU5F1/OCT4*, *SALL4* und *NANOG* in frühen Mausembryonen zeigten die Notwendigkeit eines integrierten *Pou5f1/Oct4-Sall4-Nanog*-Netzwerks für die Steuerung der frühen Embryonalentwicklung (TAN et al. 2013). Weitere Gruppen von Genen, die im 8-Zell-Rinderembryo aktiviert werden, beinhalten Untereinheiten des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 3 (EIF3)-Komplexes, die Familie der *DDB1* and *CULA-associated factors* (DCAFs), Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase sowie Gene, die für DNA-Methylierung und Chromatinstruktur relevant sind (GRAF et al. 2014a). Beispiele für letztere Gruppe sind *DNMT3B* (*DNA [cytosine-5-]methyltransferase 3 beta*), *MTA2* (*metastasis tumor antigen 2*) sowie *SMARCA4* (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4*).

Die 978 Gene, deren Aktivierung im 16-Zell-Stadium nachgewiesen wurde, gehören zum großen Teil zu den GO-Funktionsklassen „RNA-Spleißen“, „Regulation der Glykolyse“, „ATP-Biosynthese“, „Negative Regulation der Transkription“, „5S-Klasse-rRNA-Transkription vom RNA-Polymerase-III-Typ-1-Promotor“, „Zytosolische Kalziumionen-Homöostase“ und „Initiation/Elongation der Transkription vom RNA-Polymerase-II-Promotor“, wobei vor allem die Initiation metabolischer Prozesse auffallend ist. Eine detaillierte Diskussion einzelner Gene, die im 16-Zell-Rinderembryo aktiviert werden, findet sich bei GRAF et al. (2014a).

Während der weiteren Entwicklung differenziert die Morula zur Blastozyste, mit den Zellen des Trophektoderm und der Inneren Zellmasse. In der GO-Analyse der 2214 Gene, die zwischen dem 16-Zell- und dem Blastozysten-Stadium der bovinen Embryogenese aktiviert wurden, waren Terme wie „Intrazellulärer Transport“, „Regulation eines multizellulären Or-

ganismus“, „Metabolismus Nukleobasen-enthaltender Verbindungen“ sowie „Negative Regulation der Antwort auf einen Stimulus“ überrepräsentiert. Diese GO-Terme sind konsistent mit den ersten Differenzierungsprozessen während der frühen Embryonalentwicklung. Ein Beispiel für ein relativ spät aktiviertes Gen ist *CDX2* (*homeobox protein CDX-2*). Studien an murinen ES-Zellen zeigten, dass *CDX2* die Expression von *Pou5f1/Oct4* unterdrückt und damit die Differenzierung in Richtung Trophektoderm induziert (NIWA et al. 2005). Für Rinderembryonen wurde gezeigt, dass *CDX2* ebenfalls für die Trophektoderm-Linie wichtig ist, allerdings keinen Effekt auf die *POU5F1/OCT4*-Spiegel hat (BERG et al. 2011). Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass die Bedeutung von *CDX2* für die Embryonalentwicklung bei Maus und Rind unterschiedlich ist. Weitere zwischen dem 16-Zell- und Blastozysten-Stadium der bovinen Embryogenese aktivierte Gene werden von GRAF et al. (2014a) diskutiert.

6. Relevanz und Ausblick

In unserer Studie (GRAF et al. 2014b) wurden RNA-Seq-Analysen an Pools von *in vitro* produzierten Rinderembryonen durchgeführt. Es ist bekannt, dass diese ein geringeres Entwicklungspotenzial als *in vivo* generierte Embryonen haben (Übersicht in LONERGAN und FAIR 2008). Es wäre daher sehr interessant, die RNA-Seq-Experimente an *ex vivo* gewonnenen Embryonen zu wiederholen, um so neue Einblicke in die unterschiedliche Entwicklung von *in vitro* produzierten versus *ex vivo* gespülten Embryonen gewinnen zu können. Eine weitere interessante Frage wäre, wie unterschiedliche Kulturbedingungen den Zeitpunkt der embryonalen Genomaktivierung beeinflussen und ob es Auswirkungen auf die spätere Entwicklung gibt. Eine kürzlich publizierte Studie zeigte, dass Rinderembryonen um den Zeitpunkt der Major-EGA besonders sensitiv gegenüber Veränderungen ihrer Umgebung sind (GAD et al. 2012). Unser Ansatz zum Nachweis der Aktivierung individueller Gene auf der Basis von RNA-Seq-Daten könnte zur Klärung der Frage beitragen, ob eine Veränderung der Kulturbedingungen die embryonale Genomaktivierung insgesamt verschiebt oder ob einzelne Gene besonders betroffen sind.

In unserer ersten RNA-Seq-Studie (GRAF et al. 2014b) haben wir für jedes Entwicklungsstadium drei Pools von jeweils zehn Eizellen bzw. Embryonen analysiert. Der Grund dafür lag in der Tatsache, dass frühe Embryonalstadien zu einem beträchtlichen Anteil zytogenetische Veränderungen aufweisen können (DEMYDA-PEYRAS et al. 2013), die sich möglicherweise auf das Genexpressionsprofil auswirken. Dennoch ist inzwischen die RNA-Seq-Analyse einzelner Embryonen (CHITWOOD et al. 2013) oder sogar einzelner embryonaler Zellen (TANG et al. 2009, XUE et al. 2013) technisch machbar. Dadurch können neue Einblicke in die Variabilität der Genexpressionsprofile einzelner Embryonen desselben Stadiums sowie in die Transkriptomveränderungen erfasst werden, die mit den ersten Differenzierungsschritten in frühen embryonalen Stadien assoziiert sind. RNA-Seq wurde bereits für Expressionsanalysen einzelner Zellen aus humanen und murinen Embryonen verwendet, wodurch transkriptionelle Module, die bei entscheidenden Schritten der Entwicklung aktiviert werden, identifiziert werden konnten (XUE et al. 2013, YAN et al. 2013). Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob diese Module in der Entwicklung von Rinderembryonen bzw. Embryonen anderer Nutztierarten konserviert sind.

Ein anderer interessanter Aspekt ist die Erfassung von Allel-spezifischer Transkription in frühen Embryonalstadien. Auch wenn autosomale Gene im Allgemeinen biallelisch exprimiert

werden, wird bei bestimmten Genen nur ein zufällig ausgewähltes Allel exprimiert (*allelic exclusion*) (Übersicht in DENG et al. 2014). Zudem wird für etwa 1 % der autosomalen Gene eine elternabhängige, monoallelische Expression (*genomic imprinting*) angenommen (Übersicht in REIK und WALTER 2001). Eine kürzlich publizierte RNA-Seq-Analyse der allelischen Genexpression in einzelnen Zellen aus murinen Präimplantationsembryonen (CAST/EiJ × C57BL/6J) ergab 12 bis 24 % monoallelische Expression bei den autosomalen Genen, wobei eine große Varianz auch zwischen benachbarten Zellen zu beobachten war (DENG et al. 2014). Mit dem *Bos t. taurus* × *Bos t. indicus*-Kreuzungsdesign unserer Studie (GRAF et al. 2014b) sind solche Analysen auch beim Rind möglich.

Die von uns und anderen Arbeitsgruppen durchgeführten RNA-Seq-Analysen lieferten neue Einblicke in die embryonale Genomaktivierung, in die allelische Expression von Genen sowie in transkriptionelle Netzwerke, welche die frühe Embryonalentwicklung bestimmen. RNA-Seq-Daten sind eine wichtige Grundlage für die Embryo-Biosystem-Forschung, einschließlich genetischer, epigenetischer und umweltbedingter Störungen der frühen Entwicklung.

Dank

Unsere Untersuchungen zur embryonalen Genomaktivierung beim Rind wurden durch die EU-Projekte Plurisys (HEALTH-F4-2009-223485 FP7 Health 534 project) und Fecund (FP7-KBBE-2012-6 project 312097), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 1041, QBM) und den Forschungsverbund BioSysNet unterstützt.

Literatur

- AMEUR, A., ZAGHLOOL, A., HALVARDSON, J., WETTERBOM, A., GYLLENSTEN, U., CAVELIER, L., and FEUK, L.: Total RNA sequencing reveals nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in the human brain. *Nature Struct. Mol. Biol.* *18*, 1435–1440 (2011)
- BERG, D. K., SMITH, C. S., PEARTON, D. J., WELLS, D. N., BROADHURST, R., DONNISON, M., and PFEFFER, P. L.: Trophoblast lineage determination in cattle. *Dev. Cell* *20*, 244–255 (2011)
- BRAUDE, P., BOLTON, V., and MOORE, S.: Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* *332*, 459–461 (1988)
- CAMOUS, S., KOPEČNY, V., and FLECHON, J. E.: Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biology of the Cell (under the auspices of the European Cell Biology Organization)* *58*, 195–200 (1986)
- CHITWOOD, J. L., RINCON, G., KAISER, G. G., MEDRANO, J. F., and ROSS, P. J.: RNA-seq analysis of single bovine blastocysts. *BMC Genomics* *14*, 350 (2013)
- CLAVERIA, C., GIOVINAZZO, G., SIERRA, R., and TORRES, M.: Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* *500*, 39–44 (2013)
- DEAN, W. L., KELSEY, G., and REIK, W.: Generation of monoparental embryos for investigation into genomic imprinting. *Methods Mol. Biol.* *181*, 1–19 (2001)
- DEMYDA-PEYRAS, S., DORADO, J., HIDALGO, M., ANTER, J., LUCA, L. DE, GENERO, E., and MORENO-MILLAN, M.: Effects of oocyte quality, incubation time and maturation environment on the number of chromosomal abnormalities in IVF-derived early bovine embryos. *Reprod. Fert. Dev.* *25*, 1077–1084 (2013)
- DENG, Q., RAMSKOLD, D., REINIUS, B., and SANDBERG, R.: Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* *343*, 193–196 (2014)
- FAAST, R., THONGLAIROAM, V., SCHULZ, T. C., BEALL, J., WELLS, J. R., TAYLOR, H., MATTHAEI, K., RATHJEN, P. D., TREMETHICK, D. J., and LYONS, I.: Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr. Biol.* *11*, 1183–1187 (2001)
- FANG, X., YOON, J. G., LI, L., TSAI, Y. S., ZHENG, S., HOOD, L., GOODLETT, D. R., FOLTZ, G., and LIN, B.: Landscape of the SOX2 protein-protein interactome. *Proteomics* *11*, 921–934 (2011)

- FREI, R. E., SCHULTZ, G. A., and CHURCH, R. B.: Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J. Reprod. Fertil.* **86**, 637–641 (1989)
- GAD, A., HOELKER, M., BESENFELDER, U., HAVLICEK, V., CINAR, U., RINGS, F., HELD, E., DUFORT, I., SIRARD, M. A., SCHELLANDER, K., and TESFAYE, D.: Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative *in vivo* and *in vitro* culture conditions. *Biol. Reprod.* **87**, 100 (2012)
- GLASER, S., LUBITZ, S., LOVELAND, K. L., OHBO, K., ROBB, L., SCHWENK, F., SEIBLER, J., ROELLIG, D., KRANZ, A., ANASTASSIADIS, K., and STEWART, A. F.: The histone 3 lysine 4 methyltransferase, MII2, is only required briefly in development and spermatogenesis. *Epigenetics Chromatin* **2**, 5 (2009)
- GLASER, S., SCHAFT, J., LUBITZ, S., VINTERSTEN, K., VAN DER HOEVEN, F., TUFTELAND, K. R., AASLAND, R., ANASTASSIADIS, K., ANG, S. L., and STEWART, A. F.: Multiple epigenetic maintenance factors implicated by the loss of MII2 in mouse development. *Development* **133**, 1423–1432 (2006)
- GONZALEZ, B., DENZEL, S., MACK, B., CONRAD, M., and GIRES, O.: EpCAM is involved in maintenance of the murine embryonic stem cell phenotype. *Stem Cells* **27**, 1782–1791 (2009)
- GRAF, A., KREBS, S., HEININEN-BROWN, M., ZAKHARTCHENKO, V., BLUM, H., and WOLF, E.: Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal Reprod. Sci.* **149**, 46–58 (2014a)
- GRAF, A., KREBS, S., ZAKHARTCHENKO, V., SCHWALB, B., BLUM, H., and WOLF, E.: Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 4139–4144 (2014b)
- GUO, G., HUSS, M., TONG, G. Q., WANG, C., LI SUN, L., CLARKE, N. D., and ROBSON, P.: Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev. Cell* **18**, 675–685 (2010)
- HU, G., CUI, K., NORTHRUP, D., LIU, C., WANG, C., TANG, Q., GE, K., LEVENS, D., CRANE-ROBINSON, C., and ZHAO, K.: H2A.Z facilitates access of active and repressive complexes to chromatin in embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* **12**, 180–192 (2013)
- HYTTEL, P., VIUFF, D., AVERY, B., LAURINCIK, J., and GREVE, T.: Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* **108**, 263–270 (1996)
- KANKA, J., NEMCOVA, L., TORALOVA, T., VODICKOVA-KEPKOVA, K., VODICKA, P., JESETA, M., and MACHATKOVA, M.: Association of the transcription profile of bovine oocytes and embryos with developmental potential. *Animal Reprod. Sci.* **134**, 29–35 (2012)
- KATZ, J. P., PERREAULT, N., GOLDSTEIN, B. G., LEE, C. S., LABOSKY, P. A., YANG, V. W., and KAESTNER, K. H.: The zinc-finger transcription factor *Klf4* is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development (Cambridge, England)* **129**, 2619–2628 (2002)
- KHAN, D. R., DUBE, D., GALL, L., PEYNOT, N., RUFFINI, S., LAFFONT, L., Le BOURHIS, D., DEGRELLE, S., JOUNEAU, A., and DURANTHON, V.: Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. *PLOS ONE* **7**, e34110 (2012)
- KUES, W. A., SUDHEER, S., HERRMANN, D., CARNWATH, J. W., HAVLICEK, V., BESENFELDER, U., LEHRACH, H., ADJAYE, J., and NIEMANN, H.: Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19768–19773 (2008)
- LEPIKHOV, K., ZAKHARTCHENKO, V., HAO, R., YANG, F., WRENZYCKI, C., NIEMANN, H., WOLF, E., and WALTER, J.: Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. *Epigenetics Chromatin* **1**, 8 (2008)
- LI, L., ZHENG, P., and DEAN, J.: Maternal control of early mouse development. *Development* **137**, 859–870 (2010)
- LONERGAN, P., and FAIR, T.: *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* **69**, 17–22 (2008)
- LU, R., YANG, A., and JIN, Y.: Dual functions of T-box 3 (*Tbx3*) in the control of self-renewal and extraembryonic endoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 8425–8436 (2011)
- MEMILI, E., DOMINKO, T., and FIRST, N. L.: Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **51**, 36–41 (1998)
- MEMILI, E., and FIRST, N. L.: Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol. Reprod.* **61**, 1198–1207 (1999)
- MISIRLIOGLU, M., PAGE, G. P., SAGIRKAYA, H., KAYA, A., PARRISH, J. J., FIRST, N. L., and MEMILI, E.: Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18905–18910 (2006)
- MITSUI, K., TOKUZAWA, Y., ITOH, H., SEGAWA, K., MURAKAMI, M., TAKAHASHI, K., MARUYAMA, M., MAEDA, M., and YAMANAKA, S.: The homeoprotein *Nanog* is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631–642 (2003)
- NAGAO, K., ZHU, J., HENEGHAN, M. B., HANSON, J. C., MORASSO, M. I., TESSAROLLO, L., MACKEM, S., and UDEY, M. C.: Abnormal placental development and early embryonic lethality in EpCAM-null mice. *PLOS ONE* **4**, e8543 (2009)

- NATALE, D. R., KIDDER, G. M., WESTHUSIN, M. E., and WATSON, A. J.: Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transcript transitions and alpha-amanitin sensitivity during bovine preattachment development. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 152–163 (2000)
- NIWA, H., TOYOOKA, Y., SHIMOSATO, D., STRUMPF, D., TAKAHASHI, K., YAGI, R., and ROSSANT, J.: Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell* 123, 917–929 (2005)
- OSTRUP, O., ANDERSEN, I. S., and COLLAS, P.: Chromatin-linked determinants of zygotic genome activation. *Cell. Mol. Life Sci. (CMLS)* 70, 1425–1437 (2013)
- REIK, W., and WALTER, J.: Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Rev. Genet.* 2, 21–32 (2001)
- SANTOS, F., ZAKHARTCHENKO, V., STOJKOVIC, M., PETERS, A., JENUWEIN, T., WOLF, E., REIK, W., and DEAN, W.: Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.* 13, 1116–1121 (2003)
- SIRARD, M. A.: Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. *Reprod. Domestic Animals = Zuchthygiene* 47/4, 148–155 (2012)
- STEIN, P. L., VOGEL, H., and SORIANO, P.: Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Development* 8, 1999–2007 (1994)
- SVARCOVA, O., LAURINCIK, J., AVERY, B., MLYNCEK, M., NIEMANN, H., and MADDOX-HYTTEL, P.: Nucleolar development and allocation of key nucleolar proteins require de novo transcription in bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1428–1435 (2007)
- SWINBURNE, I. A., and SILVER, P. A.: Intron delays and transcriptional timing during development. *Dev. Cell* 14, 324–330 (2008)
- TADROS, W., and LIPSHITZ, H. D.: The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136, 3033–3042 (2009)
- TAMM, C., BOWER, N., and ANNEREN, C.: Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *J. Cell Sci.* 124, 1136–1144 (2011)
- TAN, M. H., AU, K. F., LEONG, D. E., FOYGEL, K., WONG, W. H., and YAO, M. W.: An Oct4-Sall4-Nanog network controls developmental progression in the pre-implantation mouse embryo. *Mol. Systems Biol.* 9, 632 (2013)
- TANG, F., BARBACIORU, C., WANG, Y., NORDMAN, E., LEE, C., XU, N., WANG, X., BODEAU, J., TUCH, B. B., SIDDIQUI, A., LAO, K., and SURANI, M. A.: mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Meth.* 6, 377–382 (2009)
- TELFORD, N. A., WATSON, A. J., and SCHULTZ, G. A.: Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 90–100 (1990)
- VALLÉE, M., DUFORT, I., DESROSIERS, S., LABBE, A., GRAVEL, C., GILBERT, I., ROBERT, C., and SIRARD, M. A.: Revealing the bovine embryo transcript profiles during early in vivo embryonic development. *Reproduction* 138, 95–105 (2009)
- VAN VLIET, J., CROFTS, L. A., QUINLAN, K. G., CZOLJI, R., PERKINS, A. C., and CROSSLEY, M.: Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors. *Genomics* 87, 474–482 (2006)
- VIUFF, D., AVERY, B., GREVE, T., KING, W. A., and HYTTTEL, P.: Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 43, 171–179 (1996)
- VIUFF, D., HYTTTEL, P., AVERY, B., VAJTA, G., GREVE, T., CALLESEN, H., and THOMSEN, P. D.: Ribosomal ribonucleic acid is transcribed at the 4-cell stage in in vitro-produced bovine embryos. *Biol. Reprod.* 59, 626–631 (1998)
- WANG, H., and DEY, S. K.: Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Rev. Genet.* 7, 185–199 (2006)
- WANG, Z., GERSTEIN, M., and SNYDER, M.: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Rev. Genet.* 10, 57–63 (2009)
- WOSSIDLO, M., NAKAMURA, T., LEPIKHOV, K., MARQUES, C. J., ZAKHARTCHENKO, V., BOIANI, M., ARAND, J., NAKANO, T., REIK, W., and WALTER, J.: 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nature Commun.* 2, 241 (2011)
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., KORSAAWE, K., LEMME, E., and NIEMANN, H.: Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 23–35 (2005)
- XUE, Z., HUANG, K., CAI, C., CAI, L., JIANG, C. Y., FENG, Y., LIU, Z., ZENG, Q., CHENG, L., SUN, Y. E., LIU, J. Y., HORVATH, S., and FAN, G.: Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500, 593–597 (2013)
- YAN, L., YANG, M., GUO, H., YANG, L., WU, J., LI, R., LIU, P., LIAN, Y., ZHENG, X., YAN, J., HUANG, J., LI, M., WU, X., WEN, L., LAO, K., LI, R., QIAO, J., and TANG, F.: Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nature Struct. Mol. Biol.* 20, 1131–1139 (2013)

Eckhard Wolf, Alexander Graf, Stefan Krebs, Valeri Zakhartchenko und Helmut Blum

- ZHANG, J., TAM, W. L., TONG, G. Q., WU, Q., CHAN, H. Y., SOH, B. S., LOU, Y., YANG, J., MA, Y., CHAI, L., NG, H. H., LUFKIN, T., ROBSON, P., and LIM, B.: Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nature Cell Biol.* 8, 1114–1123 (2006)
- ZHANG, P., ANDRIANAKOS, R., YANG, Y., LIU, C., and LU, W.: Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J. Biol. Chem.* 285, 9180–9189 (2010)

Prof. Dr. Eckhard WOLF
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
Genzentrum der LMU München
Feodor-Lynen-Straße 25
81377 München
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 89 218076800
Fax: +49 89 218076849
E-Mail: ewolf@lmb.uni-muenchen.de

Bedeutung der genomischen Prägung für landwirtschaftlich wichtige Eigenschaften bei Rind und Schwein

Norbert REINSCH (Dummerstorf)

Zusammenfassung

Bei Nutztieren ist das Ausmaß der Expression der beiden Allele bei einer Anzahl von Genen, die häufig mit frühen Wachstumsprozessen verbunden sind, ungleich und unterliegt dem systematischen Einfluss der elterlichen Herkunft. Es ist möglich, dass entweder das väterliche oder mütterliche Allel deaktiviert wird (Imprinting). Der Beitrag stellt einen Versuch zur Modellierung der additiv-genetischen Varianz unter Einbeziehung von Imprinting vor.

Abstract

In farm animals, the expression of the two alleles for a number of genes frequently connected to early growth processes is unequal and subject to the systematic influence of parental origin. It is possible that either the paternal or the maternal allele are deactivated (imprinting). This paper presents an attempt to model the additive-genetic variance taking imprinting into account.

1. Einführung

An einem genomisch geprägten Locus ist das Ausmaß der Expression der beiden Allele ungleich und unterliegt dem systematischen Einfluss der elterlichen Herkunft. Entscheidend ist dabei das Geschlecht eines Elternteils (*parent-of-origin effect*). Im Falle der paternalen Prägung (*Imprinting*) ist das väterliche Allel eines Nachkommen epigenetisch deaktiviert, während das mütterliche Allel aktiv bleibt, beim maternalen Imprinting verhält es sich umgekehrt. Diese während der Bildung von Spermien und Eizellen in spezifischer Weise neu verankerte Markierung eines Allels – etwa durch Methylierung – überdauert die spätere allgemeine epigenetische Reprogrammierung während der Embryonalphase eines Nachkommens. Die Variante einer abgeschwächten Expression (partielle Prägung) ist wohl eher die häufigere Variante im Vergleich zur völligen Stilllegung eines elterlichen Allels. Ferner kann im späteren Entwicklungsverlauf eine während früher Stadien existente Prägung abgebaut werden (z. B. GOULD und PFEIFFER 1998; *developmentally regulated imprinting*). In weiteren Fällen besteht sie nur lokal in bestimmten Organen (z. B. LEE et al. 1997, *tissue specific imprinting*), während im Restorganismus beide elterlichen Allele ein gleiches Aktivitätsniveau aufweisen.

Die Gesamtanzahl der genomisch geprägten Loci beim Säuger liegt in der Größenordnung von ca. 100 (siehe die Übersicht von REIK und WALTER 2001). Das macht, bezogen auf die Anzahl aller Gene, einen relativen Genomanteil von unter einem Promille aus. Die geprägten Loci sind im Genom in etwa einem Dutzend verschiedener *Imprintingcluster* organisiert. Ver-

mutlich hat sich evolutionär die genomische Prägung als Mittel zur bestmöglichen Verteilung der mütterlichen Ressourcen auf eine größere Anzahl von Nachkommen etabliert (MOORE und HAIG 1991). Dabei werden eher kurzfristige, einen einzelnen Wurf betreffende Aspekte mit langfristigen und die Gesamtnachkommenschaft eines Muttertieres betreffenden Aspekten ausbalanciert. Nach dieser Vorstellung fördern väterlich aktive Allele üblicherweise das fötale Wachstum der aktuellen Wurfgeschwister, möglicherweise auf Kosten späterer Nachkommen von anderen Vätern. Im Gegensatz dazu führt eine mütterlicherseits induzierte Verlangsamung des fötalen Wachstums aktuell zu einer Schonung der mütterlichen Ressourcen zu Gunsten ihrer eigenen Nachkommen aus späteren Würfen. Sollte diese Deutung des Prägungsphänomens zutreffen, wäre demzufolge vor allem mit einer Beeinflussung von Merkmalen des frühen Wachstums durch genomisch geprägte Loci zu rechnen.

Für die genetische Variation können naturgemäß nur polymorphe geprägte Loci eine Rolle spielen. Angesichts ihrer nach heutigem Wissen geringen Anzahl und ihrer vermuteten evolutionär begründeten „Zuständigkeit“ für frühes Wachstum und Entwicklung stellt sich die grundsätzliche Frage: Existieren für landwirtschaftlich wichtige Eigenschaften – mit typischerweise polygener Vererbung und meist erst nach der Geschlechtsreife abgeschlossener Merkmalsausbildung – nennenswerte Anteile der genetischen Variation, die geprägten Loci zugeschrieben werden können?

2. Forschungslinien

Die Frage nach der Existenz von geprägten Genen mit einem Beitrag zur genetischen Variation bei Nutztieren wurde bisher auf verschiedenen Wegen untersucht. Zu nennen sind eine Reihe von Versuchen zur Kartierung von genomisch geprägten *Quantitative Trait Loci* (QTL) bzw. Hauptgenen, vornehmlich beim Schwein. Genomisch geprägte QTL mit Einfluss auf Gewebeanteile im Schlachtkörper, Fleischqualität, Wachstum und reproduktive Merkmale wurden in F_2 -Kreuzungsexperimenten kartiert (DE KONING et al. 2000, 2001a, b). Beim Nutztier bekannt gewordene geprägte Hauptgene sind *IGF2* beim Schwein (JEON et al. 1999, NEZER et al. 1999, VAN LAERE et al. 2003) und *Callipyge* beim Schaf (COCKETT et al. 1994, SMIT et al. 2003), beide mit Auswirkungen auf die Körperzusammensetzung und das Wachstum von Masttieren. Obwohl ursprünglich genomische Prägung innerhalb des Tierreiches nur bei Säugern vermutet wurde, konnten in einem Kreuzungsexperiment beim Huhn geprägte QTL kartiert werden (TUISKULA-HAAVISTO et al. 1994). Noch jüngeren Datums bei Nutztieren sind Expressionsstudien mittels *Next Generation Sequencing* (PINTO 2014).

Einen eigenen Forschungsansatz stellt die Schätzung von genetischen Varianzkomponenten dar. Hierfür wird von einer Aufteilung der genetischen Varianz in verschiedene Komponenten ausgegangen, die dann zur Beschreibung der Ähnlichkeit von Verwandten unterschiedlichen Grades und zur Schätzung dieser Varianzanteile mittels genetisch-statistischer Modelle genutzt werden können. Im Ergebnis kann dann das Gesamtausmaß der genetischen Variation in einer Population und die Beiträge von Teilkomponenten (wie z. B. additiv autosomal, Y-chromosomal oder mitochondrial) quantifiziert werden. Für Züchtungszwecke wird meist allein die additiv-genetische Varianz betrachtet, während nicht-additive Komponenten (FISHER 1918, COCKERHAM 1954) vernachlässigt werden. Zum Nachweis von Prägungseffekten benötigt man mehrere additive Varianzkomponenten (HILL und KEITHLY 1988), deren Existenz mittels geeigneter statistischer Tests überprüft werden kann und die Auskunft über das Ausmaß des Va-

rianzbeitrages geprägter Loci geben. Beginnend mit der Studie von DE VRIES et al. (1994) wurden eine Reihe solcher Untersuchungen bei Rind und Schwein durchgeführt. Wie bereits von SCHAEFFER et al. (1989) und später von TIER und SÖLKNER (1993) vorgeschlagen, bestand das Prinzip der Analyse darin, neben einem additiv-genetischen Effekt für jedes Tier zusätzlich entweder einen hiervon unabhängigen väterlichen oder mütterlichen Gameteneffekt mit eigener Varianzkomponente in das Modell aufzunehmen. Dieser Gameteneffekt repräsentiert die gesamte Wirkung aller rein väterlich bzw. rein mütterlich aktiven Loci. Die entsprechende Varianzkomponente kann dementsprechend als genetische Imprintingvarianz bzw. Teil davon interpretiert werden. Im Ergebnis ordneten DE VRIES et al. (1994) rund 10 % der phänotypischen Varianz für Rückenspeckdicke und Wachstumsrate dieser elternspezifischen gametischen Variation zu. Mit Hilfe des gleichen Ansatzes schätzten ENGELLANDT und TIER (2001) signifikante väterliche gametische Varianzen für Beckenfett (14 % der phänotypischen Variation), Nierenfett (16 %) und Fleischanteil im Schlachtkörper (15 %) bei Mastbullen der Rasse Gelbvieh. Aus einem Vergleich von nacheinander ausgeführten Varianzschätzungen leiteten ESSL und VOITH (2002) den Einfluss von Imprinting auf den Eiweißgehalt, die Milchmenge, die Persistenz der Milchleistung und die Nutzungsdauer von Österreichischen Fleckviehkühen ab. Alle genannten Studien weisen die Gemeinsamkeit auf, dass sich der Imprintinganteil im Modell nur auf jeweils eine Art von vollständiger Prägung – entweder väterliche oder mütterliche – beschränkt. Schätzungen der väterlichen bzw. mütterlichen Imprintingvarianz entstammen also nacheinander ausgeführten, getrennten Analysen mit unterschiedlichen Modellen und nicht, wie erstrebenswert, einer einheitlichen Schätzung mit einem umfassenden Modell. Ein solches Modell sollte ermöglichen, sowohl väterliche als auch mütterliche Prägung gleichzeitig zu berücksichtigen und darüber hinaus auch in der Lage sein, die verschiedenen oben genannten Varianten der Prägung – partiell, gewebespezifisch, entwicklungsgesteuert – mit abzubilden. Als Ergebnis sollte ferner ein zusammenfassender Schätzwert für die von allen geprägten Loci gemeinsam verursachte Imprintingvarianz zur Verfügung stehen.

3. Modellierung der additiv-genetischen Varianz unter Einbeziehung von Imprinting

Ausgangspunkt für die am FBN neu entwickelte Imprintinganalyse war der Vorschlag von HILL und KEIGHTLY (1988) zur Modellierung der additiv-genetischen Varianz. Ihm liegt die Annahme zu Grunde, dass gleichzeitig nicht geprägte (biparental exprimierte), vollständig väterlich geprägte (rein maternal exprimierte) und vollständig mütterlich geprägte (rein paternal exprimierte) Loci ein quantitatives Merkmal beeinflussen. Dann wird der Phänotyp jedes Individuums durch drei entsprechende Beiträge genetisch bestimmt, deren Varianzen sich nach HILL und KEIGHTLY (1988) in der folgenden Matrix zusammenfassen lassen:

$$\begin{bmatrix} \sigma_b^2 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_p^2 & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_m^2 \end{bmatrix} \quad [1]$$

Die gesamte genetische Varianz ergibt sich dann als Summe dieser drei Komponenten. Es wird ferner angenommen, dass keine Kovarianzen zwischen diesen drei Beiträgen bestehen, weshalb alle Nebendiagonalelemente dieser Matrix gleich Null sind. Die Erweiterung dieser

Matrix ermöglicht es nun, dieses einfache Grundmodell so anzupassen, dass alle weiteren bekannten Formen der genomischen Prägung mit abgedeckt werden.

Die verschiedenen Prägungsvarianten lassen sich in bleibende und veränderliche Grundformen einteilen. Im bleibenden Fall ist bei der rein paternalen Prägung das väterliche (mütterliche) Allel jeweils vollständig stillgelegt, während ausschließlich das mütterliche (väterliche) Allel aktiv ist. Eine Mischform stellt die partielle Prägung dar, wobei sich zwar die Expressionsstärke in Abhängigkeit von der elterlichen Herkunft unterscheidet, aber beide Allele Aktivität aufweisen (Fall a). Veränderliche Formen ergeben sich, wenn während früher Entwicklungsstadien zunächst eine völlige oder teilweise Stilllegung nach einem der genannten Muster erfolgt, später aber eine Entfernung der Prägung stattfindet (*developmentally regulated imprinting*) und in Folge dessen eine biparentale Expression (Fälle b und c). Ähnlich kann Prägung in bestimmten Geweben vorhanden sein, in anderen hingegen nicht (*tissue specific imprinting*, ebenfalls b und c). Schließlich kann eine partielle Prägung später aufgehoben werden (Fall d).

Für die genetisch-statistische Analyse ist die Unterscheidung dieser Formen deshalb von Bedeutung, weil sich für jede dieser Varianten (a) bis (d) eine locuspezifische gametische Kovarianzmatrix angeben lässt, die eine für den jeweiligen Fall passende Abwandlung der von KEITHLY und HILL (1988) angegebenen Matrix darstellt:

$$\begin{array}{l}
 \text{a) } \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_p^2 & \sigma_{p,m} \\ 0 & \sigma_{p,m} & \sigma_m^2 \end{bmatrix} \quad [2] \\
 \text{b) } \begin{bmatrix} \sigma_b^2 & \sigma_{b,p} & 0 \\ \sigma_{b,p} & \sigma_p^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad [3] \\
 \text{c) } \begin{bmatrix} \sigma_b^2 & 0 & \sigma_{b,m} \\ 0 & 0 & 0 \\ \sigma_{b,m} & 0 & \sigma_m^2 \end{bmatrix} \quad [4] \\
 \text{d) } \begin{bmatrix} \sigma_b^2 & \sigma_{b,p} & \sigma_{b,m} \\ \sigma_{b,p} & \sigma_p^2 & \sigma_{p,m} \\ \sigma_{b,m} & \sigma_{p,m} & \sigma_m^2 \end{bmatrix} \quad [5]
 \end{array}$$

Um die genetische Kovarianz zwischen Individuen auf der Grundlage aller dieser möglichen Fälle zu modellieren, können die sechs Parameter der dargestellten elementaren Kovarianzmatrizen jeweils aggregiert und in einer gemeinsamen Matrix zusammengefasst werden, so dass alle elementar auftretenden Varianzen und Kovarianzen enthalten sind. Im Unterschied zu den elementaren Matrizen tragen nun allerdings potentiell mehrere Loci auf unterschiedliche Weise zu den verschiedenen (Ko-)Varianzen bei:

$$\begin{bmatrix} \sigma_b^2 & \sigma_{b,p} & \sigma_{b,m} \\ \sigma_{b,p} & \sigma_p^2 & \sigma_{p,m} \\ \sigma_{b,m} & \sigma_{p,m} & \sigma_m^2 \end{bmatrix} \quad [6]$$

4. Ein umfassendes Modell

Die dargelegte Beschreibung der genetischen (Ko-)Varianzkomponenten lässt sich in dieser Form allerdings nicht unmittelbar für praktische Analysen nutzen. Dies zeigt ein Blick auf die gametische Verwandtschaftsmatrix (SCHAEFFER et al. 1989), die aus Abstammungsdaten ab-

geleitet und bei geeigneter Anordnung ihrer Zeilen und Spalten prinzipiell in drei unterschiedliche Teilmatrizen zerlegt werden kann:

$$\mathbf{G} = \begin{bmatrix} \mathbf{G}_{11} & \mathbf{G}_{12} \\ \mathbf{G}'_{12} & \mathbf{G}_{22} \end{bmatrix} \quad [7]$$

Die Zerlegung zeigt, dass nur drei verschiedene Dimensionen in Form von Kovarianzmatrizen für die Schätzung von (Ko-)Varianzkomponenten zur Verfügung stehen. Diese sind: \mathbf{G}_{11} , die Verwandtschaft aller väterlichen Gameten untereinander, \mathbf{G}_{22} , die gegenseitige Verwandtschaft aller mütterlichen Gameten, und schließlich \mathbf{G}_{12} , welche die Verwandtschaft zwischen väterlichen und mütterlichen Gameten beschreibt. In Konsequenz können nur drei verschiedene Kovarianzparameter geschätzt werden, wovon jeweils eine mit einer der drei Teilmatrizen von \mathbf{G} assoziiert ist.

Es zeigt sich, dass die folgenden Summen der sechs zuvor definierten Varianzen und Kovarianzen schätzbar sind:

$$\sigma_s^2 = \sigma_b^2 + \sigma_p^2 + 2\sigma_{bp} \quad [8]$$

$$\sigma_d^2 = \sigma_b^2 + \sigma_m^2 + 2\sigma_{bm} \quad [9]$$

$$\sigma_{sd} = \sigma_b^2 + \sigma_{bm} + \sigma_{bp} + \sigma_{pm} \quad [10]$$

Zusammengefasst in einer Matrix \mathbf{S} :

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} \sigma_s^2 & \sigma_{sd} \\ \sigma_{sd} & \sigma_d^2 \end{bmatrix} \quad [11]$$

Diese Varianzkomponenten lassen sich nun genetisch interpretieren als Kovarianzmatrix zweier verschiedener additiv-genetischer Effekte, welche jedem Individuum – gleich ob männlich oder weiblich – zugeschrieben werden. Der Effekt „als Vater“ beeinflusst die Nachkommen auf andere Weise als der Effekt „als Mutter“. Der Unterschied wird durch die unterschiedlichen elternspezifischen Prägungsmuster hervorgerufen, bei Gleichheit auf DNA-Ebene. Existiert keine genomische Prägung an polymorphen Loci, so sind beide genetischen Effekte identisch. Die Elemente in der Matrix \mathbf{S} sind in diesem Falle alle gleich, was genutzt werden kann, um einen Signifikanztest für den Einfluss von genomischer Prägung auf ein Merkmal vorzunehmen.

So wie die genetischen Effekte der gleichen Art zwischen den Individuen einer Population variieren, so variiert auch die Differenz zwischen den beiden verschiedenen Effekten jedes Tieres in der Gesamtpopulation. Die Varianz dieser Differenz ist mit der Imprintingvarianz identisch. Das Verschwinden dieser Varianz ist gleichbedeutend mit der Identität beider Arten von additiv-genetischen Effekten und damit dem Fehlen von Imprintingeffekten.

Demgemäß ergibt sich die Imprintingvarianz als die Varianz einer Differenz

$$\sigma_i^2 = \sigma_s^2 + \sigma_d^2 - 2\sigma_{sd}, \quad [12]$$

die bei Gleichheit aller Elemente in der Matrix \mathbf{S} zu Null wird. Die gesamte genetische Varianz ist die Summe

$$\sigma_a^2 = \sigma_s^2 + \sigma_d^2. \quad [13]$$

Schließlich lässt sich die genetische Varianz ohne Imprintinganteil (Mendelsche Varianz) berechnen als

$$\sigma_M^2 = \sigma_a^2 - \sigma_i^2. \quad [14]$$

5. Praktische Anwendung: Imprintinganalyse für Videodaten von Schlachtkörpern

Als praktisches Anwendungsbeispiel des neu entwickelten Modells soll eine Analyse von 25 Merkmalen der Schlachtkörperzusammensetzung und des Wachstums von Mastbullen der Rasse Fleckvieh skizziert werden (NEUGEBAUER et al. 2010b), die auf Daten von ca. 65000 Tieren aufbaut. Von diesen auf Schlachthöfen erfassten Merkmalen wurden 22 mittels Videotechnik gemessen (Abb. 1).



Abb. 1 Videobild einer Rinderhälfte am Schlachtband. Die Krümmung der Lichtstreifen enthält Informationen zur Ausbildung wertvoller Teilstücke und Muskelpartien im Schlachtkörper. Zusätzlich ist das Gewicht der Hälfte bekannt (Bild: E+V Technology GmbH, 16515 Oranienburg, Deutschland).

Beispiele für Videomerkmale der Schlachtkörperzusammensetzung sind Filetgewicht, Roastbeefgewicht und Keulengewicht, während das Wachstum durch die Nettozunahme (Schlachtgewicht geteilt durch Lebensalter) beschrieben wird. Die Abstammungsdaten der Mastbullen umfassen ca. 357000 Vorfahren. Das Modell für die Beobachtungen \mathbf{y} enthält im Vektor $\boldsymbol{\beta}$ eine Alterskorrektur und die Einflüsse der unterschiedlichen Herkunftsbetriebe, sowie als genetische Einflussgrößen die Zuchtwerte \mathbf{a}_s der Väter und \mathbf{a}_d der Mütter der Mastbullen in ihren jeweiligen geschlechtsspezifischen Ausprägungen. Bei \mathbf{X} , \mathbf{Z}_s und \mathbf{Z}_d handelt es sich um die zu den Effekten gehörenden Designmatrizen und \mathbf{e} ist der Vektor der Residuen:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_s \mathbf{a}_s + \mathbf{Z}_d \mathbf{a}_d + \mathbf{e} \quad [15]$$

Die Kovarianz der zufälligen Effekte ist

$$\text{Var} \begin{bmatrix} \mathbf{a}_s \\ \mathbf{a}_d \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1/2 \mathbf{A} \sigma_s^2 & 1/2 \mathbf{A} \sigma_{sd} & 0 \\ 1/2 \mathbf{A} \sigma_{sd} & 1/2 \mathbf{A} \sigma_d^2 & 0 \\ 0 & 0 & \mathbf{W} \end{bmatrix}. \quad [16]$$

Hierbei ist \mathbf{A} die Verwandtschaftsmatrix für die Vorfahren der Mastbullen und \mathbf{W} eine Diagonalmatrix mit Elementen

$$w_i = \left[\frac{1/2 \sigma_s^2 (1 - F_{si}) + 1/2 \sigma_d^2 (1 - F_{di}) + \sigma_e^2}{1/2 \sigma_s^2 + 1/2 \sigma_d^2 + \sigma_e^2} \right]^{-1} \quad [17]$$

die zur Gewichtung der einzelnen Beobachtungen in Abhängigkeit von den Inzuchtkoeffizienten der Eltern (F_{si} , F_{di}) unter Berücksichtigung der Restvarianz σ_e^2 dienen. Die Mischmodellgleichungen lauten dann

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{W}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{X}'\mathbf{W}^{-1}\mathbf{Z}_s & \mathbf{X}'\mathbf{W}^{-1}\mathbf{Z}_d \\ \mathbf{Z}'_s \mathbf{W}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{Z}'_s \mathbf{W}^{-1}\mathbf{Z}_s + \mathbf{A}^{-1}\alpha_1 & \mathbf{Z}'_s \mathbf{W}^{-1}\mathbf{Z}_d + \mathbf{A}^{-1}\alpha_2 \\ \mathbf{Z}'_d \mathbf{W}^{-1}\mathbf{X} & \mathbf{Z}'_d \mathbf{W}^{-1}\mathbf{Z}_s + \mathbf{A}^{-1}\alpha_2 & \mathbf{Z}'_d \mathbf{W}^{-1}\mathbf{Z}_d + \mathbf{A}^{-1}\alpha_3 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \boldsymbol{\beta} \\ \mathbf{a}_s \\ \mathbf{a}_d \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}'\mathbf{W}^{-1}\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'_s \mathbf{W}^{-1}\mathbf{y} \\ \mathbf{Z}'_d \mathbf{W}^{-1}\mathbf{y} \end{bmatrix}, \quad [18]$$

wobei

$$\begin{bmatrix} \alpha_1 & \alpha_2 \\ \alpha_2 & \alpha_3 \end{bmatrix}^{-1} = \frac{1}{2\sigma_e^2} \begin{bmatrix} \sigma_s^2 & \sigma_{sd} \\ \sigma_{sd} & \sigma_d^2 \end{bmatrix} \quad [19]$$

ist.

Insgesamt zehn von allen untersuchten Merkmalen wiesen eine signifikante Imprintingvarianz auf. Die Größenordnung lag etwa im Bereich von 10 % bis 20 % der gesamten additiv-genetischen Varianz (Tab. 1). Die genetischen Korrelationen für die beiden Arten von genetischen Effekten lagen im hohen Bereich von ca. 0,8 bis 0,9 – wie bei einem vorherrschenden Einfluss nicht geprägter Gene zu erwarten ist. Jedoch wird sichtbar, dass zur Imprintingvarianz nicht

nur unterschiedliche Variabilitäten der väterlichen und mütterlichen genetischen Effekte beibringen, sondern auch ihre von 1 verschiedenen Korrelationen.

Tab. 1 Detaillierte Ergebnisse für alle Merkmale mit signifikanter Imprintingvarianz. Die relative Imprintingvarianz ist der Anteil der Imprintingvarianz an der gesamten additiv-genetischen Varianz. In Spalte fünf stehen die Korrelationen zwischen den genetischen Effekten „als Vater“ und „als Mutter“. Die Angaben zur Y-chromosomalen und mitochondrialen Varianz sind Anteile an der gesamten phänotypischen Varianz.

Merkmal (Einheit)	Genetische Standardabweichung	Relative Imprintingvarianz (%)	Heritabilität	Korrelation	y-chromosomale Varianz (%)	Mitochondriale Varianz (%)
Fleischklasse (1–15)	0,74	10,75	0,28	0,89	0,00	0,46
Fleischanteil (%)	0,43	18,67	0,26	0,81	0,04	0,08
Roastbeefgewicht (kg)	0,43	11,87	0,22	0,88	0,00	1,78
Keulengewicht (kg)	2,96	7,82	0,24	0,92	0,00	1,97
Keulengewicht warm (kg)	2,26	7,76	0,24	0,92	0,00	1,97
Oberschalengewicht (kg)	1,31	11,53	0,21	0,89	0,00	1,44
Filetgewicht (kg)	1,17	11,91	0,20	0,88	0,00	1,58
Blumengewicht (kg)	0,16	11,66	0,24	0,88	0,00	1,96
Ausschlachtung (%)	1,07	24,56	0,20	0,76	0,00	0,32
Fettklasse (1–15 Scores)	0,67	24,77	0,21	0,78	0,00	1,23

Für alle Eltern der Schlachttiere und ihre weiteren Vorfahren können Schätzwerte für ihre Imprintingeffekte mit der dazugehörigen Schätzgenauigkeit angegeben werden. Jeder Imprintingeffekt ist die Differenz zwischen den beiden für ein Individuum geschätzten Zuchtwerten „als Vater“ und „als Mutter“. Abbildung 2 veranschaulicht für vier Merkmale die Streuung aller geschätzten Imprintingeffekte. Die volle Streuung über den positiven und negativen Bereich wird erst ab einer gewissen Mindestgenauigkeit erreicht, die z. B. für das Merkmal Ausschlachtung (Abb. 2A) bei einem Wert von ca. 2 für die logarithmierte Präzision liegt. Im darunterliegenden Bereich der Abbildungen streuen mit abnehmender Präzision die Schätzwerte zunehmend weniger um den Nullwert. Für Tiere aus diesem Bereich mit eingeschränkter Streuung enthält der Datensatz weniger Informationen zur Schätzung der Imprintingeffekte, beispielsweise weil sie in der Ahnenreihe weiter entfernt stehen von den Schlachttieren mit eigenen Merkmalswerten.

Ergebnisse aus dem beschriebenen Modell liegen bisher aus vier Studien vor. Neben der oben dargestellten Analyse von Rinderdaten fanden NEUGEBAUER et al. (2010a) für 19 Merkmale der Mast- und Schlachtleistung beim Schwein signifikante Imprintingvarianzen zwischen 5 % und 10 % der additiv genetischen Varianz. TIER und MEYER (2012) ermittelten mit einem äquivalenten Modell einen Durchschnitt von 28 % für Merkmale der Körperzusammensetzung (Ultraschallmessungen) bei australischen Fleischrindern. In den gleichen Populationen fanden MEYER und TIER (2012) väterliche bzw. mütterliche Beiträge zur Imprintingvarianz, die für Wachstumsmerkmale bis zu 11 % der phänotypischen Varianz ausmachten.

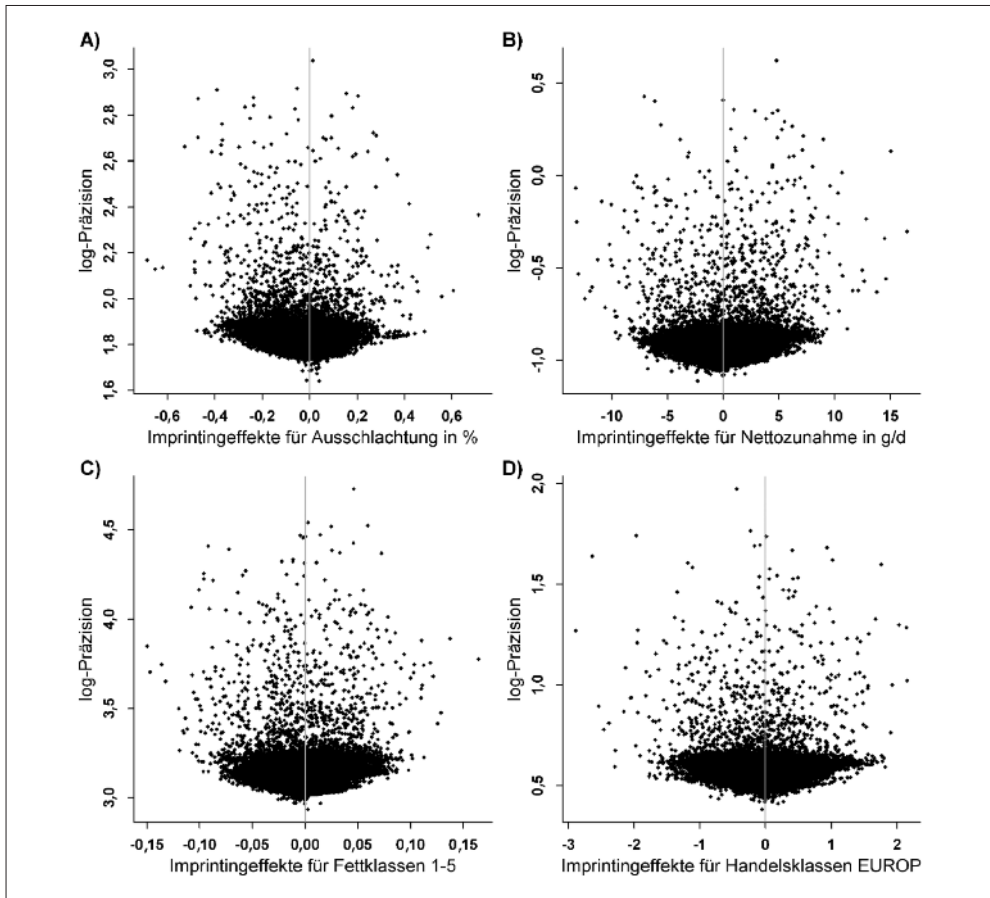


Abb. 2 Individuelle Imprintingeffekte (geschätzt als Differenz der genetischen Effekte „als Vater“ und „als Mutter“) und ihre logarithmierten Präzisionen. Die Merkmale sind Ausschlagung (A), Nettozunahme (B), Fettklasse (C) und Fleischklasse (D). Daten aus BLUNK et al. 2016.

6. Diskussion und Ausblick

Die geschätzten Anteile der Imprintingvarianz an der gesamten additiven Variabilität liegen deutlich höher als die bisher bekannte Anzahl bekannter geprägter Gene beim Säuger in Relation zur Gesamtgröße des Genoms. Möglicherweise überhöhte Werte für die Imprintingvarianz könnten durch andere genetische Faktoren hervorgerufen werden. Jedoch wurde einige Mühe darauf verwendet, solche Einflüsse auszuschalten. Dies gilt für Y-chromosomale Varianteile ebenso wie für mitochondrial verursachte, die in mehreren Untersuchungen keine Relevanz für Mast- und Schlachtleistungsmerkmale zeigten (REINSCH et al. 1999, NEUGEBAUER et al. 2010a, b). Diese Effekte besitzen eine eigene Kovarianzstruktur, die sich von derjenigen der Imprintingeffekte unterscheidet. Bei ausreichender Tiefe der verfügbaren Abstammungsdaten lassen sich ihre Einflüsse deshalb von dem der genomischen Prägung trennen.

Wie auch durch die Beispiele der *IGF2*- und der *Callipyge*-Mutationen bestätigt, können geprägte Loci nicht nur auf das frühe Wachstum Einfluss nehmen, vielmehr wirken sich früh gestellte Weichen – etwa was die Entwicklung der Muskulatur angeht – auch auf die erst später festzustellenden Eigenschaften von Masttieren aus.

Das Wachstum während der Mast und die Zusammensetzung von Schlachtkörpern standen bisher im Fokus der Untersuchungen. Dies gilt nicht nur für Schätzungen von Varianzkomponenten, sondern auch für Versuche zur Kartierung von geprägten QTL. Im Gegensatz dazu liegen für andere Merkmalskomplexe bisher noch keine oder kaum Ergebnisse vor – insbesondere zu Milchleistung, Fruchtbarkeit und funktionalen Merkmalen. Nachdem grundsätzliche methodische Fragen als geklärt angesehen werden können, gilt es nun, diese Wissenslücken durch entsprechende Arbeiten weiter zu füllen.

Die entwickelte Auswertungsmethodik lässt sich im Prinzip direkt in die Zuchtwertschätzung und Züchtungspraxis umsetzen. Für alle von der genomischen Prägung mitbeeinflussten Merkmale hätte dies den Vorteil eines realistischeren Modells für die Zuchtwertschätzung und Selektion. Dabei scheint es schwierig zu sein, bei der Auswahl von noch jungen Zuchttieren eine möglichst vollständige Ausnutzung der insgesamt vorhandenen additiv-genetischen Streuung zu erreichen, also der Summe aus Mendelscher genetischer Varianz und Imprintingvarianz. Bei Bullen lässt sich der Zuchtwert „als Vater“ aus Nachkommen direkt ermitteln, sein Zuchtwert „als Mutter“ kommt zeitlich verzögert erst bei den Nachkommen seiner Töchter zum Tragen, und dies, wegen des geringeren Verwandtschaftsgrades zu seinen Enkeln, nur in „verdünnter“ Form. Die Differenz zwischen den beiden Zuchtwerten des Bullen lässt sich also erst spät feststellen. Zudem wird über den Zuchteinsatz von Bullen kaum noch am Ende einer Nachkommenschaftsprüfung entschieden, vielmehr geschieht dies in zunehmendem Maße bereits in sehr jungem Alter auf Grundlage von Markerdaten und ihrer genomischen Zuchtwerte. Mit Hilfe von genetischen Markern für geprägte Genombereiche könnte es gelingen, Imprintingeffekte in die genomische Zuchtwertschätzung einzubeziehen und für frühe Selektionsentscheidungen nutzbar zu machen. Die beim Schwein bekannt gewordene Mutation im geprägten *IGF2*-Gen ist ein Beispiel, wo dies bereits in Populationen praktiziert wird, in denen beide Varianten auftreten. Insgesamt sind aber noch weitere Entwicklungsarbeiten auch bei anderen Spezies und für weitere Merkmale nötig. Die beschriebenen, aus dem Dummerstorfer Modell abgeleiteten individuellen Imprintingeffekte könnten dabei eine wertvolle Rolle für die Schätzung von Markereffekten spielen, wenn sie als abhängige Variablen in Assoziationsstudien eingehen und als sogenannte Pseudophänotypen (GARRICK et al. 2009) alle Informationen zum Prägungseinfluss auf die Nachkommen eines Tieres in einer Größe zusammenfassen.

Literatur

- BLUNK, I., MAYER, M., HAMANN, H., and REINSCH, N.: Parsimonious model for analyzing parent-of-origin effects related to beef traits in dual-purpose Simmental. Zur Veröffentlichung eingereichtes Manuskript (2016)
- COCKERHAM, C. C.: An extension of the concept of partitioning hereditary variance for analysis of covariances among relatives when epistasis is present. *Genetics* 39/6, 859 (1954)
- COCKETT, N. E., JACKSON, S. P., SHAY, T. L., NIELSEN, D., MOORE, S. S., STEELE, M. R., BARENDSE, W., GREEN, R. D., and GEORGES, M.: Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91/8, 3019–3023 (1994)
- ENGELLANDT, T., and TIER, B.: Genetic variances due to imprinted genes in cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 119, 154–165 (2002)

- ESSL, A., and VOITH, K.: Genomic imprinting effects on dairy- and fitness-related traits in cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* *119*, 182–189 (2002)
- FISHER, R. A.: The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Transact. Royal Soc. Edinburgh* *52/2*, 399–433 (1918)
- GARRICK, D. J., TAYLOR, J. F., and FERNANDO, R. L.: Deregression estimated breeding values and weighting information for genomic regression analyses. *Genet. Sel. Evol.* *41*, 55 (2009)
- GOULD, T. D., and PFEIFFER, K.: Imprinting of mouse *Kvlqt1* is developmentally regulated. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 483–487.
- HILL, W. G., and KEIGHTLEY, P. D.: Interaction between molecular and quantitative genetics. In: KORVER, S., VAN DER STEEN, H. A. M., VAN ARENDONK, J. A. M., BAKKER, H., BRASCAMP, E. W., and DOMMERHOLT, J. (Eds.): *Advances in Animal Breeding. Proceedings of the World Symposium in Honour of Professor R. D. Politiek, Wageningen, The Netherlands, 11–14 September 1988*; pp. 41–55. Wageningen (The Netherlands): PUDOC 1988
- JEON, J.-T., CARLBORG, Ö., TÖRNSTEN, A., GIUFFRÀ, E., AMARGER, V., CHARDON, P., ANDERSSON-EKLUND, L., ANDERSSON, K., HANSSON I., LUNDSTRÖM, K., and ANDERSSON, L.: A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the *IGF2* locus. *Nature Genet.* *21*, 157–158 (1999)
- KONING, D. J. DE, RATTINK, A. P., HARLIZIUS, B., GROENEN, M. A. M., BRASCAMP, E. W., and VAN ARENDONK, J. A. M.: Detection and characterization of quantitative trait loci for growth and reproduction traits in pigs. *Livestock Production Sci.* *72*, 185–198 (2001a)
- KONING, D. J. DE, HARLIZIUS, B., RATTINK, A. P., GROENEN, M. A. M., BRASCAMP, E. W., and VAN ARENDONK, J. A. M.: Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs. *J. Animal Sci.* *79*, 2812–2819 (2001b)
- KONING, D. J. DE, RATTINK, A. P., HARLIZIUS, B., VAN ARENDONK, J. A. M., BRASCAMP, E. W., and GROENEN, M. A. M.: Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *97*, 7947–7950 (2000)
- LEE, M. P., HU, R. J., JOHNSON, L. A., and FEINBERG, A. P.: Human *KVLQT1* gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nature Genet.* *15/2*, 181–185 (1997)
- MEYER, K., and TIER, B.: Estimates of variances due to parent of origin effects for weights of Australian beef cattle. *Animal Production Sci.* *52/4*, 215–224 (2012)
- MOORE, T., and HAIG, D.: Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet.* *7/2*, 45–49 (1991)
- NEUGEBAUER, N., LUTHER, H., and REINSCH, N.: Parent-of-origin effects cause genetic variation in pig performance traits. *Animal* *4/5*, 672–681 (2010a)
- NEUGEBAUER, N., RÄDER, I., SCHILD, H. J., ZIMMER, D., and REINSCH, N.: Evidence for parent-of-origin effects on genetic variability of beef traits. *J. Anim. Sci.* *88/2*, 523–532 (2010b)
- NEZER, C., MOREAU, L., BROUWERS, B., COPPIETERS, W., DETILLEUX, J., HANSET, R., KARIM, L., KVASZ, A., LEROY, P., and GEORGES, M.: An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the *IGF2* locus in pigs. *Nature Genet.* *21*, 155–156 (1999)
- PINTO, F.: All transcriptome sequencing of reciprocal chicken crosses to explore monoallelic expression. *Plant and Animal Genome XXII Conference. Plant and Animal Genome 2014*
- REIK, W., and WALTER, J.: Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Rev. Genet.* *2/1*, 21–32 (2001)
- REINSCH, N., ENGELLANDT, T., SCHILD, H. J., and KALM, E.: Lack of evidence for bovine Y-chromosomal variation in beef traits. A Bayesian analysis of Simmental data. *J. Anim. Breed. Genet.* *116*, 437–445 (1999)
- SCHAEFFER, L. R., KENNEDY, B. W., and GIBSON, J. P.: The inverse of the gametic relationship matrix. *J. Dairy Sci.* *72/5*, 1266–1272 (1989)
- SMIT, M., SEGERS, K., CARRASCOSA, L. G., SHAY, T., ARALDI, F., GYAPAY, G., SNOWDER, G., GEORGES, M., COCKETT, N., and CHARLIER, C.: Mosaicism of solid gold supports the causality of a noncoding A-to-G transition in the determination of the callipyge phenotype. *Genetics* *163/1*, 453–456 (2003)
- TIER, B., and MEYER, K.: Analysing quantitative parent-of-origin effects with examples from ultrasonic measures of body composition in Australian beef cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* *129*, 359–368 (2012)
- TIER, B., and SÖLKNER, J.: Analysing gametic variation with an animal model. *Theor. Appl. Genet.* *85/6,7*, 868–872 (1993)
- TUISKULA-HAAVISTO, M., KONING, D. J. de, HONKATUKIA, M., SCHULMAN, N. F., MÄKI-TANILA, A., and VILKKI, J.: Quantitative trait loci with parent-of-origin effects in chicken. *Genet. Res.* *84/1*, 57–66 (2004)
- VAN LAERE, A.-S., NGUYEN, M., BRAUNSCHWEIG, M., NEZER, C., COLETTE, C., MOREAU, L., ARCHIBALD, A. L., HALEY, C. S., BUYS, N., TALLY, M., ANDERSSON, G., GEORGES, M., and ANDERSSON, L.: A regulatory mutation in *IGF2* causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* *425*, 823–836 (2003)

Norbert Reinsch

VRIES, A. G. DE, KERR, R., TIER, B., LONG, T., and MEUWISSEN, T. H. E.: Gametic imprinting effects on rate and composition of pig growth. *Theor. Appl. Genet.* 88, 1037–1042 (1994)

Prof. Dr. Norbert REINSCH
Institut für Genetik und Biometrie
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)
Wilhelm-Stahl-Allee 2
18196 Dummerstorf
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 38208 68900
Fax: +49 38208 68902
E-Mail: reinsch@fbn-dummerstorf.de



ISSN: 0369-5034

ISBN: 978-3-8047-3415-9