



Leopoldina
Nationale Akademie
der Wissenschaften

NOVA ACTA LEOPOLDINA

Neue Folge | Band 113 | Nummer 388

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

Gottfried Brem (Hrsg.)



Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2012

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

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

NOVA ACTA LEOPOLDINA

Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Herausgegeben vom Präsidium der Akademie

NEUE FOLGE

NUMMER 388

BAND 113

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

Wissenschaftliche Vorbereitung und Organisation:

Gottfried BREM (Wien)

Mitglied der Leopoldina, Korresp. Mitglied der ÖAW

Mit 71 Abbildungen und 25 Tabellen



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2012
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.
Jedes Heft ist einzeln käuflich!**

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

Einbandbild:

Die Titelfeldgestaltung erfolgte unter Nutzung einer Abbildung der bekannten *Gläsernen Kuh* des Deutschen Hygienemuseums Dresden (Fotograf: Volker KREIDLER). Das Tiermodell dokumentierte und veranschaulichte seinerzeit den erreichten Erkenntnisstand. In der Gegenwart wird unser Wissen über die Nutztierspezies durch die Anwendung vielfältiger moderner Methoden ergänzt, und damit werden neue Möglichkeiten und interessante Perspektiven für unser Handeln auf den Gebieten der Züchtung, der Veterinärmedizin und der innovativen Grundlagenforschung erschlossen.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.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 wMÖAW und kMÖAW stehen für wirkliches Mitglied bzw. korrespondierendes Mitglied der Österreichischen Akademie der Wissenschaften.

Alle Rechte einschließlich des Rechts zur Vervielfältigung, zur Einspeisung in elektronische Systeme sowie der Übersetzung vorbehalten. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne ausdrückliche Genehmigung der Akademie unzulässig und strafbar.

© 2012 Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e. V. – Nationale Akademie der Wissenschaften

Postadresse: 06108 Halle (Saale), Jägerberg 1

Hausadresse: 06108 Halle (Saale), Emil-Abderhalden-Straße 37, Tel. +49 345 47239134

Herausgeber: Präsidium der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften

Printed in Germany 2012

Gesamtherstellung: Druck-Zuck GmbH Halle (Saale)

ISBN: 978-3-8047-3028-1

ISSN: 0369-5034

Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier.

Inhalt

BREM, Gottfried: Nachruf für Prof. Dipl.-Ing. agr. Dr. agr. Dr agr. h. c. Dr. med. vet. h. c. Horst Kräußlich	9
FIRCKS, Wolf-Dietrich VON: Eröffnung	13
STINGL, Georg: Grußwort	15
HAAS, Michel: Grußwort	17
BREM, Gottfried: Einleitung – Zur Entwicklung der Tierzucht	19

I. Genomanalysen bei Haustieren

LEEB, Tosso: Methodik der Analyse und Kartierung von Haustiergenomen	29
WIMMERS, Klaus: Stand der funktionalen Genomanalyse bei Nutztieren – Nutzung von Mikroarray-Analysen in der molekularen Tierzucht	37
ULBRICH, Susanne E.: Genomewide Analysis of Epigenetic Mechanisms	47
KUNEJ, Tanja, OGOREVC, Jernej, GORUP, Crt, CEH, Eva, ZUPAN, Blaz, und DOVČ, Peter: Komparative Genomik bei Haustieren als bioinformatischer Ansatz	61
WALLNER, Barbara, und BREM, Gottfried: Y-chromosomale Vererbung	73
BURGSTALLER, Jörg, und BREM, Gottfried: Das mitochondriale Genom	85
BRENIG, Bertram: Zirkulierende Nukleinsäuren. Vergangenheit – Gegenwart – Zukunft	97
BENNEWITZ, Jörn: Quantification of Genetic Variation in Livestock Species	107

II. Genanalysen bei Haustieren

MEDJUGORAC, Ivica: SNP-Hochdurchsatzanalysen zur Genkartierung	115
GROSSE-BRINKHAUS, Christine, CINAR, Mehmet Ulas, UDDIN, Muhammad Jasim, und SCHELLANDER, Karl: Charakterisierung vom QTL – Stand der QTL-Analyse beim Schwein	131
KNORR, Christoph: Struktur und Funktion von Kandidatengenen	143
NIEMANN, Heiner: Epigenetische Reprogrammierung bei präimplantativen bovinen Embryonen aus assistierten Reproduktionstechniken	155

III. Anwendungen der Gen- und Genomanalytik

DRÖGEMÜLLER, Cord: Erbfehler bei Nutztieren	171
LEEB, Tosso: Erbfehler bei Begleittieren	183
KÖNIG, Sven: Resistenz und Suszeptibilität gegen Krankheiten	191
SWALVE, Hermann H.: Zuchtprogramme für quantitative Merkmale auf der Basis molekulargenetischer Analysen	205
BROCKMANN, Gudrun A., BORTFELDT, Ralf H., und ZIELKE, Lea G.: Anwendungen der Individualtypisierungen beim Milchrind	223
MEYER, Heinrich H. D.: Zucht auf neue Produktionsmerkmale – Lebensmittelbiogenese in einer sich ändernden Welt	243
RENNER, Simone, BRAUN, Christina, STRECKEL, Elisabeth, und WOLF, Eckhard: Das Schwein als Modelltier in der translationalen Diabetesforschung	259

IV. Wirtschaftliche Risiken und Chancen der Genom- und Genanalytik

BRADÉ, Wilfried: Mögliche Auswirkungen der Etablierung einer genom-basierten Zuchtbewertung in der Milchrinderzucht auf Ebene des Einzelbetriebes	279
LÜHKEN, Gesine, und ERHARDT, Georg: Volkswirtschaftliche Konsequenzen der Anwendung / Unterlassung der Genanalyse am Beispiel der Zucht auf TSE-Resistenz beim Schaf	293

V. Kurzfassungen der Vorträge und Posterzusammenfassungen

FRIES, Ruedi, ECK, Sebastian, und STROM, Tim M.: HTP-Sequenzierung von Genomen ...	313
SCHLÖTTERER, Christian: Zukünftige Entwicklungen bei der Genomsequenzierung ...	315
DISTL, Ottmar: Genetische Varianten und Merkmalsausprägung	317
THALLER, Georg: Methodik zur Analyse von SNPs auf Einzeltierbasis	319
SÖLKNER, Johann, GREDLER, Birgit, MAYERHOFER, Martin, TANZLER, Johann, und EGGER-DANNER, Christa: Genomische Selektion – Entwicklung und Implementierung	321
SCHWARZENBACHER, Hermann, DOLEZAL, Marlies, SCHLÖTTERER, Christian, und FRIES, Ruedi: „Hitchhiking Mapping“ – ein neuer Ansatz zur Kartierung von QTLs in Rinderpopulationen	323
BECKER, Doreen, und DRÖGEMÜLLER, Cord: <i>PITX3</i> Mutation verursacht die vererbte Mikrophthalmie beim Texelschaf	325
ZIELKE, Lea G., BORTFELDT, Ralf H., ASSMUS, Jens, SCHMITT, Armin O., und BROCKMANN, Gudrun A.: Conserved Genomic Regions Influencing Energy Homeostasis in the Bovine Genome	327

GAD, Ahmed, HOELKER, Michael, RINGS, Franca, GHANEM, Nasser, SALILEW-WONDIM, Dessie, TESFAYE, Dawit, PHATSARA, Chirawath, SCHELLANDER, Karl, HAVLICEK, Vitezslav, and BESENFELDER, Urban: Differences in Global Transcriptome Profile of Bovine Blastocysts Derived from Superovulated or Synchronized Cyclic Heifers	329
LAENOI, Watchara, UDDIN, Muhammad Jasim, CINAR, Mehmet Ulas, GROSSE-BRINKHAUS, Christine, TESFAYE, Dawit, JONAS, Elisabeth, SCHOLZ, Armin M., THOLEN, Ernst, LOOFT, Christian, WIMMERS, Klaus, PHATSARA, Chirawath, JUENGST, Heinz, SAUERWEIN, Helga, and SCHELLANDER, Karl: Mapping Quantitative Trait Loci Associated with Leg Weakness Related Traits in Pigs	331
MAUSBERG, Theresa, DRÖGEMÜLLER, Cord, und LEEB, Tosso: Analyse der genetischen Steuerung des Haarwachstums beim Nackthund	333
REGASSA, Alemu, RINGS, Franca, HOELKER, Michael, THOLEN, Ernst, LOOFT, Christian, SCHELLANDER, Karl, and TESFAYE, Dawit: The Bi-directional Communication between Bovine Oocytes and the Companion Cumulus Cells during <i>In Vitro</i> Maturation Affects the Gene Expression of either Cell Types	335
SALILEW-WONDIM, Dessie, HOELKER, Michael, RINGS, Franca, THOLEN, Ernst, SCHELLANDER, Karl, and TESFAYE, Dawit: Diestrus Transcriptome Dynamics of Bovine Endometrium in Relation to Pregnancy Success after Embryo Transfer	337
UDDIN, Muhammad Jasim, CINAR, Mehmet Ulas, GROSSE-BRINKHAUS, Christine, TESFAYE, Dawit, THOLEN, Ernst, PHATSARA, Chirawath, WIMMERS, Klaus, LOOFT, Christian, and SCHELLANDER, Karl: Mapping QTL for Cytokines and Toll-like Receptors in a Duroc × Pietrain Resource Population	339
WORKU, Dagnachew, HOELKER, Michael, RINGS, Franca, DRILLICH, Marc, HEUWIESER, Wolfgang, THOLEN, Ernst, LOOFT, Christian, SCHELLANDER, Karl, and TESFAYE, Dawit: Altered Expression of Uterine MiRNAs and Related Molecular Pathways in the Context of Subclinical Endometritis in Bovine	341

Nachruf für Prof. Dipl.-Ing. agr. Dr. agr. Dr. agr. h. c. Dr. med. vet. h. c. Horst Kräußlich

Kurz nach dem Symposium „Das gläserne Tier“, am 16. April 2010, ist der Nestor der deutschsprachigen Tierzucht, Prof. em. Dr. Dr. h. c. mult. Horst KRÄUSSLICH verstorben. Seine bereits stark angeschlagene Gesundheit hatte ihn daran gehindert, am Symposium teilzunehmen. Wir gedenken an dieser Stelle seiner, denn ohne sein Wirken hätte die Forschungsrichtung, die beim Symposium behandelt wurde, in Deutschland nicht die bekannte Entwicklung genommen und Bedeutung erhalten.

Horst KRÄUSSLICH wurde am 2. August 1926 in Fürth am Berg geboren. Dort besuchte er von 1933 bis 1937 die Volksschule und anschließend in Neustadt (bei Coburg) bis 1944 die Realschule und Oberrealschule. Nach Kriegsdienst und Gefangenschaft schloss er 1947 eine landwirtschaftliche Lehre mit der Gehilfenprüfung ab und besuchte dann die Landwirtschaftsschule in Coburg. Von 1948 bis 1951 folgte ein Studium der Landwirtschaft an der Technischen Universität München, Fakultät für Landwirtschaft in Weihenstephan, das er als Diplom-Landwirt abschloss. Von 1951 bis 1954 war er Referendar im Bayerischen Landwirtschaftlichen Staats- und Tierzuchtdienst und anschließend bis 1959 Tierzuchtassessor am Tierzuchtamt Passau. Im Jahr 1956 promovierte er an der Technischen Universität München mit einer Arbeit über die Merinozucht („Erbwertermittlung in Woll- und Körperigenschaften an Stammböcken der bayerischen Merinolandschafzucht“). 1959 wechselte er ins Landwirtschaftsministerium in München, wo er sowohl als Referent für Schweine- als auch für Rinderzucht tätig war und Geschäftsführer diverser einschlägiger Verbände und Arbeitsgemeinschaften wurde. 1970 wurde er, äußerst ungewöhnlich für einen Ministerialbeamten, ohne Habilitation auf den Lehrstuhl für Tierzucht der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München berufen und mit der Leitung des Lehr- und Versuchsgutes in Oberschleißheim beauftragt.

Ich erinnere mich gut an seine Schilderung seines akademischen Werdeganges. Er wollte habilitieren, aber die Veterinärmedizinische Fakultät der LMU, an die er sich gewandt hatte, wollte das nicht. Das hatte, wie sich bald zeigte, nichts mit ihm persönlich zu tun, sondern war eine hochschulpolitische Aktion, die mit dem potenziellen Habilitater in Zusammenhang stand. Dass man Horst KRÄUSSLICH persönlich durchaus wollte, zeigte sich unmittelbar, nachdem das Ordinariat altersbedingt frei und neu besetzbar geworden war: Die Veterinärmedizinische Fakultät hat ihn, sozusagen „freihändig“, aus seiner Position als Referent für Rinderzucht am Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten direkt als Ordinarius an die LMU geholt.

Ein absoluter Glücksfall einer Berufung. Professor KRÄUSSLICH wurde ein Vorstand, der sich, unbelastet von überstandenen universitären Grabenkämpfen, ganz auf seine Vision fokussierte: durch Forschung und Entwicklung neue Grundlagen für die Tierzucht zu erarbeiten. Und in diesem Sinne ließ er uns arbeiten, hat uns angeleitet und begleitet, war offen für unsere Sorgen und Nöte, hat für uns finanzielle Mittel und administrative Wege gesucht und gefunden, uns unterstützt, ohne uns zu protegieren, kurz und gut, er hat alles für uns im Übermaß getan.

Horst KRÄUSSLICH hat erstmals in Deutschland, aufbauend auf eigenen Untersuchungen und den Erfahrungen von Alan ROBERTSON, den er besucht hatte, eine Zuchtwertschätzung auf Milchleistungsmerkmale mit einem abgewandelten *Contemporary-Comparison*-Verfahren entwickelt. Daraus entstand das Bayerische Besamungszuchtprogramm mit gezielten Paarungen, das in seinen Grundfesten seit mehr als einem halben Jahrhundert Bestand hat.

Von außerordentlicher Bedeutung war sein Beitrag zur Zusammenführung von Tiermedizin und Tierzucht. Er hat es in außergewöhnlicher Weise geschafft, beide Disziplinen in fruchtbarer Zusammenarbeit zu vereinen. Dabei waren die Biotechniken der Reproduktion, denen er sich gewidmet hatte, sein zentrales Thema, nicht als Selbstzweck, sondern in ihrer Bedeutung für die gegenwärtige und zukünftige Förderung der Tierzuchtwissenschaft und züchterischen Praxis. Deshalb war ihm die Entwicklung des Embryotransfers und der damit assoziierten Techniken ein besonderes Anliegen. Niemand sonst in Tierzuchtkreisen hat die Bedeutung der Reproduktionstechniken beim weiblichen Zuchttier für die Tierzuchtwissenschaften so frühzeitig und umfassend erkannt wie er.

Neben der Reproduktion war er aber auch allen anderen Aspekten der Tiergesundheit verbunden und hat Wegweisendes initiiert. Ob es sich um Klauengesundheit, Fitness, Stoffwechselkrankheiten, Mastitis, Resistenz und vieles andere handelte, sein Ansatz für die züchterische Beeinflussung dieser Merkmale war immer konsequent und folgerichtig und deshalb am Ende auch erfolgreich.

Die Zeit ist nicht stehen geblieben, und vieles von dem, was wir auf diesem Gebiet heute in Deutschland beobachten können, resultiert aus seiner weitschauenden Entscheidung, ein Thema, lange bevor es für viele ein Thema geworden war, aufzugreifen und auszubauen. Gentransfer, Klonierung durch Kerntransfer, SNP-Analytik und genomische Selektion wurden von Horst KRÄUSSLICH für die Tierzucht angedacht und angeschoben. Er hätte dieses Symposium genossen.

Sein Credo war es, theoretische Weiterentwicklungen zur Grundlage praktischer Anwendungen in der Nutztierzucht zu machen. Das hat auch viele Zweifler und Ungläubige auf den richtigen Weg gebracht. Die deutschsprachige Tierzucht, insbesondere aber die bayerische Tierzucht, wäre ohne sein Wirken nicht zu dem geworden, was sie ist. Professor KRÄUSSLICH war ein Hochschullehrer, wie man ihn sich nicht besser wünschen konnte.

Sein Weitblick war auch für seine Mitarbeiter und Schüler enorm hilfreich. Er hat uns gefördert, ohne uns zu tragen. Wir als seine Schüler sind sehr dankbar, dass er uns auf unseren eigenen wissenschaftlich akademischen Weg gebracht hat. Ohne seine Förderung und Unterstützung, seine allzeit gewährte freundliche Hingabe für unsere Sorgen und Nöte, seine beispiellose Bereitschaft, uns auf unserem Weg an- und weiterzuleiten, wären wir nicht geworden, was wir sind. Er war uns ein wirklicher akademischer Vater, ein Lehrer im hervorragenden Sinn, kein Besserwisser-Lehrmeister, sondern ein ruhiger, gütiger und verständiger und vor allem verständnisvoller Betreuer.

Wir haben von ihm gelernt, wie wichtig es ist, den Nachwuchs zu fordern und zu fördern. Er hat 6 habilitierte Schüler und konnte sich über 12 akademische Enkel und viele akade-

mische Urenkel freuen. Diese arbeiten und lehren an fast allen wichtigen einschlägigen Universitäten in Deutschland, Österreich und der Schweiz.

Horst KRÄUSSLICH war selbst nicht Mitglied der Leopoldina, aber neben seinem eigenen Sohn, Prof. Dr. Hans-Georg KRÄUSSLICH, sind 5 seiner Schüler und Enkel Leopoldiner.

Die LMU hat Professor KRÄUSSLICH in Wertschätzung seiner wissenschaftlichen Arbeit 1991 zum Dr. honoris causa veterinariae promoviert. Ein Jahr zuvor hatte ihm die Agrarwissenschaftliche Fakultät in Gödöllő in Ungarn das Ehrendoktorat für Landwirtschaft verliehen.

Auch mit Eintritt in seinen beruflichen Ruhestand hat er weiter wissenschaftlich publiziert, mitunter genau so erfolgreich wie manch einer seiner noch im Berufsleben stehenden Kollegen. Seine Aktivitäten in dieser Zeit waren einerseits im Umfeld seiner früheren Arbeit begründet, aber auch neuen Themen gewidmet. So hat er sich in dieser Zeit mit neuen Entwicklungen beim Rechtsschutz und der Patentierung auseinandergesetzt. Nach seiner Emeritierung suchte er den Weg zurück in die angewandte Tierzucht und vereinte Wissenschaft, Verbandstätigkeit und dörfliche Herkunft. Er war nie Theoretiker, sondern ein Tierzuchtenthusiast, der die Bedeutung und die Chancen sich neu entwickelnder wissenschaftlicher Disziplinen früh und hellsichtig erkannte und dann konsequent, auch gegen Widerstände, nutzte.

Professor KRÄUSSLICH war mit der Philosophie vertraut, Immanuel KANT schätzte er besonders. Ein Zitat von KANT kennzeichnet die Person Horst KRÄUSSLICH in idealer Weise: „Die Weisheit geht auf das Gute, die Klugheit auf das Nützliche.“

Dieser Tagungsband ist dem ehrenvollen Gedenken an Horst KRÄUSSLICH gewidmet.

Gottfried BREM ML, kMÖAW (Wien)
Im Namen seiner Schüler

Eröffnung

Wolf-Dietrich VON FIRCKS (Wien)

Rektor der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Sehr geehrte Damen und Herrn,
insbesondere sehr geehrter Herr Prof. BREM,
sehr geehrter Herr Prof. STINGL,
sehr geehrter Herr Prof. WINNACKER und
sehr geehrter Herr Dr. HAAS,

ich begrüße Sie heute hier recht herzlich im Namen der Veterinärmedizinischen Universität Wien und im eigenen Namen. Es freut mich ganz besonders, dass es dem tatkräftigen Engagement von Herrn Prof. Dr. BREM wieder gelungen ist, eine gemeinsame Tagung von Leopoldina, der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Gesundheitsministerium und Veterinärmedizinischer Universität Wien zu einem aktuellen Thema mit internationaler Fachkompetenz auszurichten.

Wenn der plakative Titel vom „Gläsernen“ Tier: Ein- und Ausblicke in Genome und Gene von Haustieren“ durchaus ängstliche Assoziationen weckt, weil eine Gleichsetzung mit dem Bedrohungspotential des „Gläsernen Menschen“ erfolgt, durch welchen wir jeder Intimsphäre beraubt wären, so würde ich dem nachhaltig entgegenreten. Ich selbst habe schon immer den Standpunkt vertreten, dass Geheimniskrämerei nur zur Förderung von Geheimdiensten und Spionagetätigkeit führt und der Wissenschaftsbetrieb insbesondere von größter Transparenz und Offenheit lebt. Das gesamte Publikationswesen mit externer Begutachtung hat nur deshalb das heutige hohe Niveau erreicht, weil der Gedanke der Nachvollziehbarkeit und über die individuelle innere Erfahrung hinausgehenden Verallgemeinerungsfähigkeit als qualitative Merkmale objektiver Erkenntnis inzwischen anerkannt sind.

Generationen von Botanikerinnen und Botanikern sowie Zoologinnen und Zoologen wären froh, wenn ihnen für die Erstellung von Verwandtschaftsbeziehungen und Abstammungsgeschichten die heutigen Instrumente der Genomanalyse zur Verfügung gestanden hätten. Das mühsame Nachvollziehen Linnéscher Kategorisierungen anhand äußerer Merkmale und Reproduktionsmöglichkeiten ist dadurch mit objektiven Werkzeugen ergänzt, teilweise ersetzt worden. Auch nicht einordenbare Tierarten, wie z. B. das Schnabeltier, lassen sich heute in dem Stammbaum der Entwicklung sinnvoll abbilden, und die Evolutionstheorie DARWINS hat ein nicht mehr zu erschütterndes Fundament erhalten. Selbst größte Ähnlichkeiten, wie zwischen den Augen des Tintenfisches und denen der Menschen, bei gleichzeitig ganz anderer Entwicklungsgeschichte lassen sich plausibel zurückverfolgen. Und dieses ist

nicht ein Spiel im Elfenbeinturm, sondern hat auch ganz praktischen Nutzen und Konsequenzen, sowohl wenn es um die Aufklärung von Erbkrankheiten als auch bessere Züchterfolge bei Nutztieren geht.

Im Gegensatz zu früher ist die Zucht im Hinblick auf bestimmte angestrebte Merkmale sehr gezielt möglich. Anstatt ein ganzes Feld zu ernten, wenn man eine Blume sucht, kann diese nun direkt gepflückt werden oder (wenn unerwünschte Effekte vermieden werden sollen), statt den Heuhaufen mit der Lupe nach der Stecknadel zu durchsuchen, benutzen wir den Hochleistungsmagneten.

Entgegen den weitverbreiteten Ängsten vor der Gentechnologie gilt es festzuhalten: der Effekt ist derselbe, nur schneller und Ressourcen schonender, woran gerade auch im Interesse des Tierschutzes (und jede der Methoden ist als Tierversuch einzustufen, trotz unterschiedlicher Bewertung im Gesetz) ein ethisches Interesse bestehen sollte. Hinzu kommen die im Interesse von Mensch und Tier liegende Möglichkeit der Produktion von Medikamenten über den Einsatz von Bakterien bis hin zur Milchkuh; letztlich im ganzen Bereich der Komparativen Medizin.

Ich bin somit sicher, dass auch diese Tagung dazu beitragen wird, dass mit wissenschaftlichen Methoden bessere Lösungen zum Wohle von Mensch, Tier und Umwelt gefunden werden. Ich wünsche Ihnen einen guten Verlauf.

Wolf-Dietrich VON FIRCKS
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
A-1210 Wien
Österreich

Grußwort

Georg STINGL ML, wMÖAW (Wien)

Präsident der mathematisch-naturwissenschaftlichen Klasse der ÖAW

Sehr geehrte Damen und Herren,

namens der Österreichischen Akademie der Wissenschaften möchte ich Sie sehr herzlich zum Symposium „Das ‚gläserne‘ Tier – Ein- und Ausblicke in Genome und Gene von Haustieren“ begrüßen. Dieses von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina und der Österreichischen Akademie der Wissenschaften gemeinsam veranstaltete Symposium ist eine weitere hochkarätige wissenschaftliche Veranstaltung, mit der die beiden Akademien ein hochaktuelles Thema von großer gesellschaftlicher sowie auch politischer Relevanz aufgreifen.

Führende internationale Experten werden die neuesten Forschungsergebnisse zum Thema vorstellen und deren Bedeutung für einen verantwortungsvollen Einsatz diskutieren. Mit der Organisation dieser Tagung kommen die Leopoldina und die ÖAW einer ihrer ganz wesentlichen Rollen nach: dem Aufgreifen wichtiger Themen der Gegenwart und deren Diskussion im gesellschaftlichen und gesellschaftspolitischen Kontext. Was ist der Status quo, welche Herausforderungen kommen auf uns zu, und welche Entscheidungen sind zu treffen?

Bereits mehrfach haben die beiden Akademien Themen am Puls der Zeit in den Mittelpunkt der breiten wissenschaftlichen Diskussion gestellt und sowohl der interessierten Öffentlichkeit als auch den politischen Entscheidungsträgern hoch qualifizierte Informationen zur Verfügung gestellt.

Zweimal haben sich beispielsweise Symposien mit dem Thema „Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)“ befasst: 2001 hat man in der Tagung „BSE – Wahnsinn und Wirklichkeit“ internationales Fachwissen über BSE aus verschiedenen Fachdisziplinen zusammengeführt. Im Juli 2005 trafen sich erneut internationale BSE-Experten in Wien um Bilanz über die Entwicklungen in der biowissenschaftlichen Grundlagenforschung, der Epidemiologie, der Veterinärmedizin, der Nachweismethodik und der Umsetzung der bis dahin erlassenen Bestimmungen zu ziehen. Thema jenes Symposiums war „BSE – Status quo und Quo vadis“. Im Rahmen dieser Veranstaltung wurden neben grundlegenden Aussagen zur Prion-Hypothese, zu Pathogenesemodellen und genetischen Komponenten auch Ansätze zu medizinisch-therapeutischen Aspekten und Fragen zur Nahrungs- und Futtermittelkette vorgestellt und diskutiert. Ebenfalls Thema waren BSE-Tests. Gastgeberin bei beiden Symposien war die Veterinärmedizinische Universität Wien.

Ein weiteres gemeinsames Symposium der beiden Akademien fand im Jänner 2006 unter dem Titel „Symposium on Autoimmunity“ statt. Diesmal im Festsaal der Österreichischen

Akademie der Wissenschaften. Es setzte sich mit den grundsätzlichen Mechanismen der Autoimmunität und neuen systemischen Ansätzen, die zu einem besseren Verständnis dieser Mechanismen beitragen sollen, auseinander. Neue Entstehungsmodelle einzelner organspezifischer Autoimmunkrankheiten wurden dabei vorgestellt. Darauf basierend wurden neue Therapieansätze diskutiert.

Zuletzt widmete sich im Oktober 2008 ein gemeinsames Symposium der beiden Akademien dem Thema „Individuelle und globale Ernährungssituation – gibt es (noch) eine Lösung?“. Experten und Expertinnen aus Deutschland, Österreich und der Schweiz setzten sich mit Fragen der globalen Nahrungsmittelverfügbarkeit sowie der individuellen Ernährungssituation auseinander, mit Entwicklungen auf dem Nahrungsmittelsektor, der Situation in Entwicklungsländern sowie medizinischen Aspekten. Diskutiert wurde, welche globalen und individuellen Handlungsalternativen zur Verfügung stehen in einer Welt, die gleichzeitig verhungert und verfettet.

Im Mittelpunkt des heute beginnenden Symposiums steht ein Thema, das auf eine mehr als zehntausendjährige Tradition zurückblickt, bei dem die Gesellschaft aber aufgrund neuester wissenschaftlicher Erkenntnisse vor völlig neuen Entwicklungen steht: Die systematische Tierzucht, eine der ältesten Beschäftigungen der Menschheit, die seit etwa dreihundert Jahren durch die Wissenschaft unterstützt wird, tritt in eine neue Ära. Noch nie zuvor in der Kulturgeschichte bestand die Möglichkeit, in so kurzer Zeit durch Gendiagnose, Gentransfer, Genomklonierung und genomische Selektion die genetischen Konstellationen von Tieren gezielt zu verändern.

Mit diesen neuen Möglichkeiten ist jedoch auch eine besondere Verantwortung verbunden, die zu einer vernünftigen Anwendung von Gen- und Reproduktionstechniken in der Tierzucht auffordert und gleichzeitig verpflichtet, Missbrauch zu verhindern. Die Arbeit der Wissenschaftler ist hier nicht darauf beschränkt, herauszuarbeiten, was möglich ist, sondern sich auch den Fragen zu stellen, welche Herausforderungen auf die Gesellschaft zukommen und welche Entscheidungen in Zukunft zu treffen sind.

Sehr geehrte Damen und Herren!

Lassen Sie mich abschließend meinen Dank aussprechen: an die Schwesterakademie Leopoldina für die langjährige hervorragende Zusammenarbeit, dem wissenschaftlichen Leiter dieses Symposiums, dem Mitglied beider Akademien, Gottfried BREM sowie allen an der Veterinärmedizinischen Universität Wien mit der Organisation befassten Mitarbeitern und nicht zuletzt dem Bundesministerium für Gesundheit für die finanzielle Unterstützung.

Prof. Dr. Dr. h. c. Georg STINGL
Österreichische Akademie der Wissenschaften (ÖAW)
Dr. Ignaz Seipel-Platz 2
A-1010 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 51581/1234
Fax: +43 1 51581/1275
E-Mail: Georg.Stingl@oeaw.ac.at

Grußwort

Michel HAAS (Wien)

Bundesministerium für Gesundheit

Magnifizenz,
sehr geehrte Mitglieder der Leopoldina und
der Österreichischen Akademie der Wissenschaften,
sehr geehrte Anwesende!

Ich darf Sie im Namen des Gesundheitsministeriums bzw. des Bereiches „Verbrauchergesundheit“ in Vertretung des Bereichsleiters Mag. HERZOG und auch als Ko-Sponsor dieser Tagung sehr herzlich begrüßen.

Das vorgesehene Programm enthält eine umfassende Darstellung des derzeitigen Wissensstandes zur Genomanalytik mit Hauptblickrichtung zum heute vorliegenden Thema „Ein- und Ausblicke in Genome und Gene von Haustieren“. Diese Veranstaltung wird aber nicht nur dafür, sondern auch für die Anwendung von Genanalysen in der Humanmedizin eine Reihe neuer Erkenntnisse bringen. Das „gläserne Tier“ führt somit rückgekoppelt auch zum „gläsernen Menschen“ und umgekehrt, um auch dieses Schlagwort zu gebrauchen.

Als Vorsitzender der gemäß dem Gentechnikgesetz eingerichteten Gentechnikkommission des Bundes hat für mich diese Veranstaltung daher auch unter diesem Aspekt für uns eine besondere Bedeutung.

Allgemein ist dazu festzustellen, dass die Erforschung der biologischen Grundlagen des Lebens derzeit mit einer für den Laien nicht mehr überschaubaren Geschwindigkeit vor sich geht. Wie in der Einleitung zum Programm hervorgehoben, stellt auch aus diesem Grund die Nutzung dieser Erkenntnisse in der Tierzucht und in der Humanmedizin für alle Beteiligten, sei es die Wissenschaft, aber auch die Gesundheitspolitik, neue Herausforderungen und eine besondere Verantwortung dar, dies sowohl aus wissenschaftlich-ethischer Sicht, aber auch mit Blick auf die einzusetzenden Ressourcen.

Ich bin überzeugt, dass die Teilnahme so vieler hochrangiger Wissenschaftler an diesem Symposium zu allen Aspekten der vorliegenden Thematik auch hervorragende Ergebnisse erbringen wird.

In diesem Sinne wünsche ich den Veranstaltern dieses Symposiums und allen Teilnehmern den besten Erfolg.

MR Dr. Michel HAAS
Bundesministerium für Gesundheit
Sektion II – Recht und Gesundheitlicher Verbraucherschutz
Radetzkystraße2
A-1030 Wien
Österreich

Einleitung – Zur Entwicklung der Tierzucht

Gottfried BREM ML, kMÖAW (Wien, Österreich)

Viribus unitis – mit vereinten Kräften wollen wir uns in den nächsten drei Tagen wieder einmal bei einem gemeinsamen Symposium der Leopoldina und der Österreichischen Akademie der Wissenschaften einem neuen Thema zuwenden. Was mich besonders freut ist, dass sich dieses Symposium erstmals in der Reihe mit tierzüchterischen Themen im engsten Sinn befasst.

In den nächsten Tagen werden wir uns gewissermaßen im Fokus moderner und innovativer Tierzüchtungsforschung bewegen. Innovationen entstehen aus Erkenntnissen und Methoden der Grundlagenforschung, die in der angewandten Forschung zielgerichtet weiterentwickelt und für die Praxis vorbereitet werden. Zu allen drei Bereichen werden Sie in den nächsten Tagen Neues und auch Überraschendes hören.

Ein Blick ins Programm zeigt, dass dieses Symposium auch eine Leistungsschau der deutschsprachigen Tierzuchtwissenschaften ist. Fast alle einschlägigen Institute an agrarwissenschaftlichen und veterinärmedizinischen Universitäten sind mit ihren zentralen Arbeitsbereichen vertreten. Diese drei Tage und Abende sollen auch Möglichkeiten bieten, in bi- und multilateralen Gesprächen, Neues zu diskutieren und das dann vielleicht auch gemeinsam zu bearbeiten.

Noch einige Bemerkungen zur Wahl des Titels unseres Symposiums, insbesondere zum ersten Teil des Titels, der ja nun zwar nicht wirklich irritierend, aber doch vielleicht Aufmerksamkeit erregend ist. Wir kennen alle das Adjektiv „gläsern“ – von dem es nebenbei bemerkt keine Steigerung gibt – in seiner Bedeutung „aus Glas bestehend oder gefertigt“. Im direkten übertragenen Sinn meint gläsern auch noch „so beschaffen wie Glas“ oder „ähnlich wie Glas“ und impliziert damit auch Eigenschaften wie durchsichtig oder zerbrechlich.

Dass all dies hier nicht gemeint ist, bedarf keiner Erläuterung. Der Titel „Das Gläserne Tier“ löst hingegen eine eindeutige Assoziation zum ähnlichen und sehr viel geläufigeren Begriff des „Gläsernen Menschen“ aus. Gemeint ist die Analogie zu dem – in früher ungeahntem Umfang – überwachten und überwachbaren Menschen. Das Adjektiv gläsern ist (in Internet-Zeiten) mit fast allen Mensch-Subjekiven kombiniert worden, ob nun der „gläserne“ Bürger, Wähler, Konsument, Politiker, Unternehmer, Patient, und was weiß ich nicht noch alles.

Übrigens, 71 % der Bevölkerung nutzen das Internet. Interessant erscheint, dass progressive Internet-Nutzer offenbar nicht die geringste Scheu haben, gläsern zu werden. Sie stellen als ungehemmte Selbstdarsteller alles ins Netz, je privater und intimer, umso lieber, schlimmer geht's nimmer – wohl auch nicht dümmer. Empörung flammt nämlich auf, wenn dann trennungs- oder scheidungswillige Partner, Personalbüros, Aufnahmeeinrichtungen,

Finanzbehörden und Strafverfolgung, Medienvertreter oder wer auch immer sich dieser Informationsquelle bedienen. Sobald das ruchbar wird, passiert etwas geradezu grotesk Schizophrenes. Es wird nach dem Staat gerufen, er möge das unterbinden. Ausgerechnet Vater Staat, der sonst als Überwachungsstaat apostrophierte, soll die Privatsphäre jetzt schützen – im Internet? Was soll er denn wie unterbinden? Den persönlichen Internet-Exhibitionismus oder die allumfassende menschliche Neugier?

Die aus der Datenschutzdiskussion stammende Metapher des gläsernen Menschen wird auch benutzt, um die zunehmenden Möglichkeiten der DNA-Analytik beim Menschen vor Augen zu führen, die ungeahnten Aufschluss über körperliche und geistige Eigenschaften geben können. Das führt und muss zu Recht zu intensiven Diskussionen führen, denn hier geht es um individuelle Daten, um persönliche Unversehrtheit, und um Selbstbestimmung.

Hier hat es die Tierzucht eindeutig einfacher, und das sollte durch die Titelwahl auch zum Ausdruck kommen. Tierzucht will Tiere so gläsern wie irgend möglich, und sie darf das auch wollen. Der Begriff „gläsernes Tier“ ist – noch – nicht negativ besetzt.

Ein im Sinne des Wortes gläserner Mensch als Menschenmodell aus Kunststoff wurde 1930, dem Jahr der Eröffnung des Deutschen Hygiene-Museums in Dresden, präsentiert. Um präzise zu sein, es handelte sich um eine „Gläserne Frau“, erst später kamen auch der „Gläserne Mann“ und dann auch die „Gläserne Kuh“ in die Ausstellung. Als kleine Randnotiz sei erwähnt, dass der DDR-Ministerrat 1956 bei den Dresdner Spezialisten eine gläserne Kuh orderte, die 1959 zur Sensation auf der Landwirtschaftsausstellung in Neu-Delhi wurde, was wegen der dortigen „Kuh-Heiligkeit“ nicht wirklich überrascht.

Im Fachbereich Veterinärmedizin Berlin können Sie sich am Standort Dahlem übrigens detailliert über Entstehung, Formen und Folgen von BSE (Bovine spongiforme Enzephalopathie) informieren. Farbige beleuchtete Röhren zeigen im Inneren einer „Gläsernen Kuh“ die Krankheitsherde an und zeichnen den Verlauf nach. Sie bietet eindrucksvolle Einsichten in den ansonsten zwar erkennbaren, aber nicht sichtbaren Wahnsinn.

Von der BSE-Krise ist es nicht weit zur gläsernen Kuh des Arbeitskreises Stadt-Land-Ökologie. Hier ist „gläsern“ die Metapher für offene Information über Herkunft und Schicksal des Lebensmittels Rindfleisch. Rückverfolgbarkeit und Herkunftssicherung sind nun zugegebenermaßen ein Steckpferd von mir. Die Idee war, den Konsumentenschutz einzuspannen, um mit diesem Vehikel eine populationsweite Beprobung unserer Nutztierbestände, die dann auch für züchterische Zwecke verfügbar wäre, zu realisieren. Schon vor über zehn Jahren ist es uns gelungen, die technischen Probleme der zuverlässigen und qualifizierten Ohrstanzproben-Gewinnung beim Einziehen der Ohrmarken zu lösen und für die Extraktion der Proben sowie die Isolation der DNA effiziente und sehr kostengünstige Hochdurchsatzverfahren zu etablieren. Das erinnert mich an den Ausspruch: „Das ist keine neue Technologie – das habe ich selber erfunden!“

Völlig misslungen ist die politische Umsetzung dieses Vorhabens. So sammelt man seine Erfahrungen und wird doch nicht wirklich gescheitert, wenn man scheitert. Apropos gescheit: Das ist ja der alte Jammer, dass sich die Dummen so unglaublich sicher und die Gescheiten so anhaltend voller Zweifel sind.

Einen Aspekt, den der pharmakogenomischen Nutzung solcher DNA-Proben, will ich hier selbst kurz ansprechen, weil wir dazu – mangels fortgeschrittener tiermedizinischer und tierzüchterischer Forschung – keinen Vortrag haben werden.

Arzneimittelwirkungen schwanken – wie man weiß – in Abhängigkeit von der genetischen Konstellation des individuellen Patienten von unwirksam bzw. nutzlos über die gewünsch-

te ideale therapeutische Wirkung bis hin zum Auftreten von hoch gefährlichen Nebenwirkungen. HIPPOKRATES hatte noch formuliert: „Was Krankheiten betrifft, so hat man zwei Möglichkeiten: zu heilen oder wenigstens nicht zu schaden.“ Heute gibt es ernstzunehmende Schätzungen, wonach allein in Deutschland jährlich etwa 17 000 Menschen an Nebenwirkungen von Arzneimitteln sterben. Verantwortlich dafür gemacht wird der Genotyp des Patienten, der den Abbau von Medikamenten beschleunigt, verlangsamt oder verhindert. Und dafür wieder ursächlich sind Mutationen oder Polymorphismen in den Genen der das Medikament verstoffwechselnden Enzyme.

Mit Hilfe der Pharmakogenomik wird also eine „individualisierte Medizin“ angestrebt, bei der ein Patient das für sein Genmaterial maßgeschneiderte Medikament in der vorhergesagt wirksamen Dosierung erhält. Im Februar 2010 wurde vom deutschen Bundesministerium für Forschung der Münchner Cluster „M⁴ Personalisierte Medizin – Eine neue Dimension der Medikamentenentwicklung“ für die nächsten drei Jahre mit 40 Millionen Euro Fördermitteln ausgestattet.

In der Humanmedizin gibt es bereits konkrete praktische Anwendungen. Bei Brustkrebs erfolgt z. B. die Applikation des Antikörpers Herceptin erst nach einer spezifischen Genotypisierung der Patientinnen, weil etwa 50 % auf diesen Antikörper nicht ansprechen. Dadurch wird die Belastung der Patientin mit einem nutzlosen Therapeutikum vermieden, die weit über 10 000 Euro betragenden Kosten eingespart und wertvolle Zeit für die Anwendung alternativer Behandlungen gewonnen.

Ein Beispiel aus der Kleintiermedizin ist die auf einem Defekt des MDR1-Gens beruhende, bei manchen Hunderassen beobachtete Empfindlichkeit gegen Ivermectin®. In der Nutztiermedizinischen Praxis kann ich bislang noch kein Beispiel nennen. Aber selbst wenn, wäre die Umsetzung vor Ort extrem aufwändig und würde viel zu viel Zeit in Anspruch nehmen. Das müsste aber nicht so bleiben.

Begleiten Sie mich bei einem Blick in die Zukunft. Unterstellen wir, dass die veterinärmedizinische Pharmakogenetik herausgefunden haben wird, welche Genotypen wie auf Medikamente reagieren. Die Bereitstellung solcher Informationen könnte in Zukunft dann sogar als Zulassungsvoraussetzung für neue Medikamente vorgeschrieben worden sein.

Bei vorliegenden populationsumfassenden DNA-Proben wäre eine entsprechende Typisierung möglich. Sie werden in mehreren Beiträgen hören, dass das nötige SNP-Typisierungspotenzial bereits heute zur Verfügung steht, und in zwanzig Jahren wird das auch keine nennenswerten Kosten mehr verursachen. Codiert über die HIT-Identifikationsnummer der Tiere, werden die pharmakogenetischen Daten aus dem SNP-Screening für alle in Frage kommenden Medikamente und Tiere in der Datenbank abgelegt. Auch die elektronische Datenverfügbarkeit vor Ort, also im Stall, ist im Prinzip über ein entsprechend ausgestattetes Handy heute schon kein Problem mehr.

Im Jahr 2030 könnte ein kurativer Besuch in der Nutztierpraxis etwa so ablaufen:

- die Kollegin/der Kollege im Stall scannt über den Barcode auf der Ohrmarke oder den elektronischen Chip die Identität des Tieres,
- stellt eine Diagnose,
- entscheidet sich für ein therapeutisches Medikament,
- kontaktiert per Handy die entsprechende Datenbank und
- erhält innerhalb von Sekunden die dort vorgehaltene Information über die genetische Verträglichkeit und Informationen darüber, ob und in welcher Dosierung das gewählte Medikament für den Patienten geeignet ist oder nicht bzw. welche Genotyp-gestützte medikamentelle Alternative es gibt.

Letztendlich wird bei dieser Entwicklung der konventionelle Beipackzettel ersetzt durch einen individuellen, elektronisch verfügbaren Beipackzettel, für jeden potenziellen Patienten!

Damit ließen sich arzneimittelbedingte Todesfälle und Nebenwirkungen vermeiden, unwirksame Arzneimittel gezielt einsparen und durch die optimierte Behandlung Heilungsaussichten verbessern und Arzneimittelrückstände reduzieren.

Im Gegensatz zur Humanmedizin, wo Datenschutzfragen und eine Fülle von ethischen und rechtlichen Problemen beim Umgang mit belastenden genetischen Informationen gelöst werden müssen, haben wir es in der Tiermedizin auch bei dieser Nutzung des „gläsernen Tieres“ viel leichter, weil weniger Problem beladen.

Dass noch Probleme kommen könnten, kann man nie ausschließen. Ich denke an den seinerzeit, während der überbordenden Gentechnikdiskussion von Kollegen WINNACKER geprägten Begriff der „Tomaten-Seelsorge“. Der Eindruck drängt sich auf, dass die Abnahme der Inanspruchnahme christlicher Seelsorge einhergeht mit zunehmender Verirrung in abwegige Bereiche. Noch regt sich aber niemand ernsthaft darüber auf, wir würden die individuellen Persönlichkeitsrechte von Tieren verletzen, wenn wir uns deren genetische Konstellationen anschauen. Über die Konsequenzen tierzüchterischen Handelns wird ja ohnehin viel lamentiert.

Die Tierzucht ist mit den neuen Techniken quasi auf den Punkt gekommen, genauer gesagt, auf Punktwolken, wenn man sich die Datenmenge bei der SNP-Genotypisierung vergegenwärtigt. Die erwartete Entwicklung auf der Kostenseite ist erfreulicherweise eingetreten. Bei der derzeit üblichen Verwendung eines 50K-Chips kostet die Typisierung pro SNP gerade noch mal 0,003 €. Sollen aber in der Anwendung für Abstammungssicherung oder Identitätsüberprüfungen lediglich 40 SNPs untersucht werden, liegt der Betrag pro SNP noch beim etwa 600-Fachen. Aber auch hier werden wir in den nächsten Jahren durch technologische Neuentwicklungen weitere Kostensenkungen haben.

Die Tierzucht unterliegt, wie jede aktive Wissenschaft, einem starken Wandel. Stillstand ist nicht Bewahren, sondern Rückschritt. Tierzüchter müssen in Generationen denken, wenn sie Erfolg haben wollen. Das Symposium wird deutlich machen, was heutzutage und in naher Zukunft in der Tierzucht möglich ist, und mit der Pharmakogenomik habe ich gerade einen Bogen in die Zukunft der Tiermedizin gespannt.

So wie es aussieht, bin ich mittlerweile einer der ältesten anwesenden universitären Tierzüchter. Ein gewisses Alter verführt auch Nicht-Historiker dazu, in die Vergangenheit zu blicken – also zurück zu unseren Anfängen. Vor etwa 700 000 Jahren tritt der Mensch in Mitteleuropa auf, erste nachgewiesene Siedlungen stammen aus der Zeit vor ca. 300 000 Jahren. Vor etwa 36 000 Jahren treffen wir in Europa auf den *Homo sapiens*, der durch Verbesserung der Jagd die Hälfte aller Großsäuger vernichtet respektive verzehrt hat.

Zigtausende von Jahren hatten Mensch und Tier – geprägt vom gegenseitigen Existenzkampf – in einer Welt unausgeschöpfter Reserven gelebt. Aber für den *Homo sapiens* lieferte die Natur nicht mehr ausreichend nach, was der Mensch entnahm. Ein Problem das uns heute wieder geläufig ist.

Was aber war die Alternative des prähistorischen Menschen? Entweder hungern bzw. verhungern oder sich etwas einfallen lassen. *Homo sapiens* war durch sein leistungsfähigeres Gehirn und intellektuelle Weiterentwicklung dazu auch in der Lage.

Der Wandel von der aneignenden Lebensweise der Sammler und Jäger zur erzeugenden Wirtschaftsweise von Bauern und Hirten ging einher mit gesellschaftlichen Veränderungen sowie mit veränderten Ritualen und Vorstellungen. Eine Hypothese geht noch weiter, indem

sie religiöse Kulte und die Errichtung von Tempelanlagen, die über 11 000 Jahre zurückreichen, als wesentlichen Grund für das Aufkommen der Sesshaftigkeit im Neolithikum sieht.

Das Aufkommen produzierender Wirtschaftsweisen in der Jungsteinzeit wird gerne als Neolithische Revolution bezeichnet. Der Terminus Evolution wäre angemessener, denn für die wichtigsten Erfindungen wie Sesshaftigkeit, Keramik und die Tier- und Pflanzenzucht waren über 5000 Jahre nötig.

Die Domestikation war der erste und wichtigste Umbruch in der Geschichte der Menschheit, natürlich nicht die einzige, aber die bis dahin wohl wichtigste kulturelle Leistung des Menschen. Ohne Kulturpflanzen und Haustiere und die dadurch ermöglichte Befreiung von den Zwängen der Nahrungsbeschaffung aus der Wildnis würde es nichts geben: keine Städte, keine Hochkulturen, keine Zivilisationen, keine Welt, wie wir sie heute kennen. Sicher ist, keine Industriegesellschaft kann ohne gute Landwirtschaft funktionieren. Das wird oft vergessen oder verdrängt, aber die globale Ernährungssituation macht nachdrücklich deutlich, wie wichtig die Landwirtschaft auch heute für die Menschheit ist.

Wie aber kam es zu dieser für die Entwicklung der Menschheit so entscheidenden Domestikation? „Nix gwis woß ma ned“ – wie wir Bayern in unserer typischen doppelten Verneinung gerne sagen. Wir können nur erahnen, was sich vor zehntausend Jahren abgespielt hat, wie die Idee entstand, zum Ausgleich des allmählichen Zusammenbruchs der Wildtierbestände und des Rückgangs der natürlichen Ressourcen mit der Domestikation eine aktive Gegenstrategie zu entwickeln und umzusetzen. Die Erfindung des Ackerbaus war offenbar kein singuläres Ereignis. Unabhängig voneinander entstand er erwiesenermaßen weltweit dreimal: im Fruchtbaren Halbmond des Nahen Ostens, in Südchina und in Mittelamerika. Als eine wesentliche Ursache für den Beginn des Ackerbaus und der Vorratshaltung im Vorderen Orient wird auch der Klimawandel zu Beginn der Warmzeit angesehen.

Meine Spekulation ist, dass die entscheidenden Schritte für die Domestikation von Tieren als Nahrungslieferanten vor allem Frauen getan haben. Die Frauen saßen zu Hause mit einer Schar hungriger Kinder und waren sauer. Sauer, weil es zu wenig zu essen gab, und sauer, weil die Männer dauernd unterwegs waren. Die von den Frauen praktizierte Sammelei von Wildpflanzen und Kleingetier brachte auch zu wenig ein, weil die Umgebung des Lagers im wahrsten Sinne des Wortes bald abgegrast war. Durch die anhaltende Präsenz der Frauen an einem fixen Ort kam es wohl auch zur Beschäftigung mit geschwächten, hilflosen oder jungen Tieren. Erleichtert wurde diese Annäherung dadurch, dass Frauen keinen so ausgeprägten Drang hatten, diese Tiere unmittelbar zu töten. Primäre Instinkte von Frauen sind auf Fürsorge und Zuwendung gerichtet. Schauen Sie sich an, wie Frauen auf neugeborenes oder schutzbedürftiges Leben reagieren. Natürlich haben auch wir Männer unseren Jagdinstinkt mittlerweile weitestgehend zurückgedrängt.

Irgendwann wurden dann die von den Frauen in ihre Obhut aufgenommenen Tiere bzw. deren Nachkommen zur Nahrungsgewinnung herangezogen. Die Idee war geboren! Auch Domestikation war kein singuläres Ereignis, sie war sozusagen ein Ergebnis ihrer Zeit. Schon die Domestikation lehrt uns, dass Ideen mitunter wesentlicher als Wissen sind. Aus Ideen wird mittels Forschung Realität. Dabei entstehen systemimmanent auch Fehler, aber wer keine Fehler macht, hat nicht genug neue Dinge ausprobiert.

Etwa 7000 v. Chr. finden sich in Zentraleuropa Anzeichen für einen beginnenden Ackerbau. Mittels y-chromosomaler Marker fand man, dass etwa 20 % der neolithischen Einwanderer aus dem Nahen Osten nach Mitteleuropa immigriert sind. Sie brachten Ackerbau und Viehhaltung zu uns. Bauern mit den Nutztierarten Rind, Schwein, Schaf und Ziege, die Korn anbauten, traten an die Stelle der mesolithischen Jäger, Sammler und Fischer.

Die Paläoanthropologie belegt, dass die Bevölkerung nach der Einführung des Ackerbaus stark anwuchs; ihre ausreichende Versorgung wäre durch Jagen und Sammeln nicht möglich gewesen.

Die Schattenseiten sollen nicht unerwähnt bleiben. Innerhalb größerer Populationen vermehrten sich Erreger, wie z. B. Rinderpest, und sie verschwanden nicht so schnell wieder wie bei frei lebenden Tieren. Nachweislich erkrankten wesentlich mehr Menschen als vorher, vor allem an Infektionen. Viele dürften durch häufigen und engen Kontakt mit Vieh nach der Einführung der Viehzucht entstanden sein. Zoonosen, die heute immer noch einer der gefährlichsten Aspekte der Nutztierhaltung sind, haben demnach bereits in prähistorischer Zeit eine Rolle gespielt.

Das Sesshaftwerden hatte auch zur Folge, dass Konflikten nicht mehr ausgewichen werden konnte. Die Bevorratung von Nahrung, Saatgut und Viehherden war eine Art früher Kapitalbildung, die den Raub attraktiv machte. Der Krieg wurde erfunden. An die Stelle der Scharmützel zwischen Jägergruppen traten Kriege zwischen Siedlungsgesellschaften und marodierenden Banden. Raubzüge wiederum erzwangen Vorkehrungsmaßnahmen, wie beispielsweise die Stadtmauer von Jericho zeigt.

Mit der Domestikation der Haustiere begann auch der Streit zwischen Hirten und Ackerbauern. In Genesis (4,8) heißt es: „Und es geschah nach einiger Zeit, da brachte Kain von den Früchten des Ackerbodens dem HERRN eine Opfergabe. Und Abel auch, er brachte von den Erstlingen seiner Herde und von ihrem Fett. Und der HERR blickte auf Abel und auf seine Opfergabe; aber auf Kain und auf seine Opfergabe blickte er nicht. [...] Da wurde Kain zornig, erhob sich gegen seinen Bruder Abel und erschlug ihn.“ Der Ackerbauer Kain erschlug also aus Neid seinen Schafe züchtenden Bruder. Manchmal drängt sich der Eindruck auf, in den heutigen Streitereien zwischen Vegetariern und „Fleischessern“ würden diese Auseinandersetzungen munter fortleben – Gott sei Dank nicht mit alttestamentarischem Ausgang.

Schon bei der Domestikation wurde intuitiv selektiert. Über viele Generationen kam es zu genetisch fixierten Veränderungen des Verhaltens und anderer Merkmale unserer Haustiere. Die vom Menschen kontrollierte Paarung führte zur Vermehrung der von ihm gewünschten Phänotypen und damit indirekt zur Fixierung entsprechender Genotypen. Die Veränderungen des Genpools unserer Nutztiere durch die Domestikation waren weit umfassender und gravierender als alle züchterischen Maßnahmen, einschließlich gentechnischer Verfahren, die wir seit zweihundert Jahren nutzen.

Insgesamt wurden nur etwa 50 Tierarten domestiziert, aus denen mehr als 5000 Rassen gezüchtet worden sind. Die meisten von ihnen sind in ihrem Bestand gefährdet, viele sind schon ausgestorben oder ihr Verlust steht bevor. Deshalb wird viel über die Biodiversität bei landwirtschaftlichen Nutztieren und deren Erhaltung diskutiert. Neue Methoden zur Quantifizierung genetischer Variation erlauben eine gezieltere Auswahl.

Der Domestikation folgte die tradierte Zucht. Wissenschaftliche Fundamente gibt es seit 250 Jahren. Am Beginn stand Robert BAKEWELL (1725–1795) mit Ahnenbewertung und Inzuchtpaarungen. Der entscheidende große Durchbruch kam mit den von Gregor MENDEL (1822–1884) vor rund 150 Jahren formulierten Gesetzmäßigkeiten der qualitativen Vererbung. In den 1920er Jahren folgten mit der Populationsgenetik die Grundlagen für die Nutzung der quantitativen Vererbung. Mit künstlicher Besamung und Embryotransfer kamen Reproduktionstechniken als Hilfsmittel der Züchtung dazu, in den letzten 25 Jahren wurden Gentransfer und Klonierung und jetzt die genomische Selektion entwickelt.

Der Tierzüchter braucht genetische Vielfalt, der Tierproduzent schätzt Uniformität. Zucht ist ohne Vielfalt nicht möglich, Produktion wird durch Vielfalt erschwert. Dieses Spannungsfeld zwischen Vielfalt und Uniformität wurde bei Schweinen und Hühnern durch die Entwicklung und Etablierung von Hybridzuchtprogrammen auf einen hohen Standard gebracht.

Aber auch die Mikroelektronik sei an dieser Stelle erwähnt. Sie ermöglicht nicht zuletzt eine Anpassung der Tierhaltung an den Lebensrhythmus der Nutztiere an Stelle der Anpassung der Tiere an den Arbeitsrhythmus des Menschen. Von enormer Bedeutung für die moderne Tierzucht ist die elektronische Datenverarbeitung. Schon bei der Optimierung der Zuchtwertschätzung waren moderne Computerprogramme von entscheidender Bedeutung für eine anerkannt hohe Aussagekraft der Zuchtwerte. Jetzt, mit den schier unfassbar großen Datenmengen, die uns Genom- und Genanalysen in immer größer werdendem Umfang liefern, werden Computerkapazitäten und Verarbeitungsprogramme zum limitierenden Faktor.

In der Genetik erleben wir überaus spannende Zeiten. Zunehmend zeigt sich, dass zwischen Genotyp und Umwelt noch eine weitere Komponente liegt. Sie gehört zum Genom, weil sie letztendlich an der DNA fixiert ist, und sie stammt aus der Umwelt, von der sie geprägt wird. Man spricht von Epi-Genetik, einer Über-Genetik, und meint damit einen weiteren Mechanismus vererbbarer Veränderungen der Genexpression. Sie werden nicht über Sequenzänderungen der Basen kodiert, sondern auf Chromatinebene nach einem eigenen epigenetischen Code kontrolliert. Die Sensation ist, dass dieser Code offenbar vererbt wird. Wie sich epigenetische Vererbung auf Selektion und Evolution auswirkt bzw. ausgewirkt hat, weiß noch niemand wirklich zu erklären. Wieder einmal ist ein Dogma, das der Ausschließlichkeit genetischer Vererbung, ins Wanken geraten.

Die neuen Forschungen zur epigenetischen Formung von DNA und Genen über Generationen hinweg lassen alte Fragen zur Vererbung von erworbenen Eigenschaften wieder fröhliche Urständ feiern, und der Lamarckismus erscheint wie ein Menetekel an der Wand. Ich möchte in diesem Zusammenhang in Erinnerung rufen, dass in der Sowjetunion bis in die 1960er Jahre aus ideologischen Gründen keine Mendel-Genetik gelehrt werden durfte. Wer nun hämisch gen Osten blickt, sei daran erinnert, dass in mehreren US-amerikanischen Bundesstaaten bis heute keine Evolution gelehrt werden darf.

Der altgriechische Ausdruck *Symposion*, heute in der latinisierten Form als *Symposium* bezeichnet, steht sinngemäß seit dem 6. Jahrhundert v. Chr. für „gemeinsames, geselliges Trinken“, bei dem Reden zu bestimmten Themen gehalten wurden. Die Übersetzung als Gastmahl führte dazu, im *Symposion* fälschlich nur ein ausgelassenes Trink- und Essgelage zu sehen. Für die Griechen der Antike stand aber die ritualisierte Geselligkeit im Mittelpunkt.

Wir haben das offizielle Reden und das ritualisierte Trinken tageszeitlich getrennt. Heute Abend führen wir Sie zu Speis und Trank quasi in den Himmel, genauer gesagt ins Café-Restaurant „Oktogon am Himmel“ in der Himmelstraße. Damit dies niemand zu Kopfe steigt, geht's am Donnerstagabend zwar nicht in die Hölle, aber doch in Wiens Untergrund. Im Esterházy-Keller befinden sie sich in historischen Gemäuern, wo sich seinerzeit schon die Verteidiger Wiens bei freiem Wein gegen die Türken Kraft und Mut angetrunken haben. Man wird Ihnen am Donnerstagabend Grünen Veltliner, Blaufränkischen und typische Heurigenspeisen kredenzen. Dort herrscht übrigens *Liberalitas Viennensis*, d. h., es wird auch Bier ausgeschenkt. Ich wünsche uns vom Genuss angeregte und die fachliche *Disputatio* anregende Gespräche.

Es ist mir eine ehrenvolle Pflicht, mich bei Herrn HERZOG vom Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend sehr herzlich dafür zu bedanken, dass uns aus seinem Hause finanziell wohlwollende Unterstützung gewährt wird. Ich danke der Leopoldina und der Ös-

terreichischen Akademie der Wissenschaften für ihre Zustimmung zur Durchführung dieses Symposiums und bedanke mich bei allen, die uns bei der Vorbereitung und Durchführung tatkräftig unterstützt haben. Das gilt an erster Stelle für Herrn Christian GRUBER und seine Mitstreiterinnen und Mitstreitern.

Unserer Universität, ihrer Leitung und dem Personal danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die Hilfe bei der technischen Durchführung. Ihnen allen danke ich, dass Sie gekommen sind und unserer Thematik die Ehre Ihrer Aufmerksamkeit schenken.

Wir wollen die Vorträge und Poster in einem Tagungsband, den die Leopoldina und die Österreichische Akademie der Wissenschaften herausgeben werden, zusammentragen. An dieser Stelle geht mein Dank nochmals an die Referenten für die Manuskripte, die wir, soweit sie nicht schon vorliegen, bald zu erhalten hoffen.

Bei PRÄTORIUS heißt es schon 1669: „sie finden sich als brüder ein bey wein und bier [...] Gläserne Bruderschaft bricht so leicht als das glas selbst.“ So hoffen wir, dass alles heil bleibt, Gläser und Freundschaften und mögen Himmel und Keller zur Weiterentwicklung der Freundschaften beitragen.

Nun aber frisch ans Werk. Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit.

Prof. Dr. Gottfried BREM
Veterinärmedizinische Universität Wien
Institut für Tierzucht und Genetik
Veterinärplatz 1
A1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250775600
Fax: +43 1 250775692
E-Mail: gottfried.brem@vu-wien.ac.at

I. Genomanalysen bei Haustieren

Methodik der Analyse und Kartierung von Haustiergenomen

Tosso LEEB ML (Bern, Schweiz)

Mit 1 Abbildung und 2 Tabellen

Zusammenfassung

Die Genomanalyse bei Haustieren hat in den letzten zehn Jahren bahnbrechende Fortschritte gemacht, die noch vor 20 Jahren kaum vorstellbar waren. Im Jahre 1999 wurde die erste Fassung der menschlichen Genomsequenz veröffentlicht, welche mehrere hundert Millionen Euro Forschungsgelder kostete. Die technologischen Entwicklungen während der Sequenzierung des menschlichen Genoms kamen anschließend den Haustieren zu Gute: Aufbauend auf der Perfektionierung der klassischen Sanger-Sequenzierungstechnik wurden seit 2003 die Genome von Honigbiene, Hund, Huhn, Rind, Pferd und Schwein entschlüsselt, wobei die Kosten für die Sequenzierung eines Säugergenoms mit dieser Technologie auf etwa 20 Millionen Euro fielen. Seit dem Jahr 2007 wurden mehrere sogenannte *Next-generation-sequencing*-Technologien verfügbar, die eine Effizienzsteigerung der DNA-Sequenzierung um mehr als drei Größenordnungen gegenüber der Sanger-Technik erlauben. Mit diesen Technologien werden in den nächsten Monaten die Genome des Schafs, der Ziege und der Katze zu prognostizierten Kosten von einigen hunderttausend Euro entschlüsselt werden. Bereits heute werden besonders wertvolle Zuchttiere vollständig resequenziert. Die neuen Sequenzierungstechnologien stellen uns aber auch vor große Herausforderungen, was die Analyse und Speicherung der riesigen Datenmengen anbelangt.

Gleichzeitig mit der Entschlüsselung der Genomsequenzen wurde jeweils auch die innerartliche Variabilität der Sequenzen zwischen verschiedenen Individuen analysiert. So wurden für die sequenzierten Haustiere jeweils weit mehr als eine Million Einzelbasenaustausche, sogenannte SNPs, identifiziert. Die Entwicklung von hochparallelen Genotypisierungsmethoden erlaubt heute die effiziente Genotypisierung von tausenden bis hunderttausenden dieser SNPs. Die SNP-Genotypisierung findet schon heute weitreichende Anwendungen von der Identitäts- und Abstammungssicherung über die Kartierung von merkmalsassoziierten Genvarianten bis zur genomischen Zuchtwertschätzung.

Abstract

Genome analysis in domestic animals has seen dramatic advances over the last 10 years, which might have seemed impossible only 20 years ago. In 1999 the first version of the human genome sequence became available at an estimated cost of several hundred million Euro. The technological developments during the human genome project subsequently benefitted research in domestic animals. With the perfection of the Sanger sequencing technology, starting in 2003 the genomes of honey bee, dog, chicken, cattle, horse, and pig were deciphered. The costs for sequencing a mammalian genome using Sanger technology dropped to approximately 20 million Euro. Since 2007 several so-called next generation sequencing technologies became available, which increase the efficiency more than 1000-fold compared to the conventional Sanger technology. It is anticipated that the genomes of sheep, goat, and cat will be deciphered using these technologies at projected costs of a few hundred thousand Euros. The complete re-sequencing of valuable breeding animals has become reality even today. However, the novel sequencing technologies also face us with new challenges regarding the analysis and storage of huge datasets.

Simultaneously with the genome sequences, the intraspecific variability between individuals was analyzed. For each of the sequenced domestic animals more than a million single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified. The development of highly parallel genotyping technologies allows the efficient analysis of thousands to hundreds of thousands of these SNPs. Today SNP genotyping has far-reaching applications including parentage verification, mapping of trait associated gene variants, and genomic selection.

1. Anfänge der Genomanalyse bei Haustieren

Ende der 1980er Jahre fassten einige visionäre Wissenschaftler den Plan, das menschliche Genom vollständig zu sequenzieren. Zum damaligen Zeitpunkt waren die technischen Voraussetzungen dafür noch nicht annähernd entwickelt, und das menschliche Genomprojekt wurde ein Unterfangen, das in seiner Größe und Komplexität mit dem amerikanischen Apollo-Raumfahrtprogramm der 1960er Jahre oder mit den großen Experimenten der Teilchenphysik mit Tausenden von beteiligten Wissenschaftlern verglichen werden kann. Demgegenüber standen natürlich für die Erforschung der Haustiergenome von jeher nur relativ bescheidene Ressourcen zur Verfügung. Anfang der 1990er Jahre konnten mit Hilfe von zytogenetischen Techniken, wie z. B. der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, die ersten Gene physisch einzelnen Chromosomen zugeordnet werden. Daraus entstanden die ersten Genkarten von Haustieren, in denen anfänglich nur einige Dutzend Gene verzeichnet waren (ECHARD et al. 1992). Parallel dazu konnten die ersten genetischen Karten von Haustiergenomen erstellt werden, auf denen zumeist Mikrosatellitenmarker enthalten waren, deren Beziehungen zu den Genen anfänglich unbekannt waren (ELLEGREN et al. 1994). Eine wichtige technologische Entwicklung stellte die Einführung der sogenannten *Radiation-hybrid*-Karten dar. Mit dieser Technologie konnten Ende der 1990er Jahre sowohl Gene als auch Mikrosatellitenmarker rasch und zuverlässig kartiert werden, so dass Karten mit einigen tausend Markern von den wichtigsten Haustieren entstanden (RAUDSEPP et al. 2008). Während diesen ersten Anfängen der Genomanalyse wurde sehr schnell klar, dass die Reihenfolge der Gene zwischen nah verwandten Organismen wie z. B. den Säugetieren hoch konserviert ist. Es wurde erkannt, dass große Chromosomenabschnitte oder manchmal sogar ganze Chromosomen zwischen verschiedenen Säugern konserviert sind (GOUREAU et al. 1996). Daraus entstand die sogenannte vergleichende Genkartierung, bei der anhand einer bekannten Genreihenfolge bei den gut kartierten Spezies wie z. B. Mensch oder Maus die Position der orthologen Gene bei den Haustieren extrapoliert wurde. So wurde es zum Beispiel möglich, BAC-Genbanken von Haustieren *in silico* zu durchmustern, indem die Randsequenzen der Klone mit dem menschlichen Genom verglichen wurden (LEEB et al. 2006).

2. Genomsequenzierungen

Die Kettenabbruchmethode zur DNA-Sequenzierung wurde 1977 durch Frederic SANGER eingeführt und beherrschte anschließend für 30 Jahre die Genomanalyse (SANGER et al. 1977). Ein weiterer Meilenstein war 1983 die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Kary MULLIS und die breite Einführung thermostabiler DNA-Polymerasen (SAIKI et al. 1988). Zusammen mit weiteren wichtigen technologischen Entwicklungen, insbesondere bei der Klonierung von DNA-Fragmenten in Bakterien und Hefen, bildeten diese Methoden die Grundlage für die späteren Genomsequenzierungsprojekte. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die historische Entwicklung der Genomsequenzierung anhand einiger wichtiger Organismen.

Zur Sequenzierung komplexer Genome wurden zwei komplementäre Strategien eingesetzt (GREEN 2001). Das öffentlich finanzierte humane Genomprojekt wurde mit der sogenannten „clone by clone“-Strategie durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine äußerst detaillierte physische Karte angefertigt, die es erlaubte, ein minimales Set an überlappenden BAC-Klonen

Tab. 1 Meilensteine der Genomsequenzierung

Jahr	Spezies	Genomgröße	Gene	Literatur
1992	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Chr. III	315 kb	182	OLIVER et al. 1992
1995	<i>Haemophilus influenza</i>	1,83 Mb	1800	FLEISCHMANN et al. 1995
1997	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12 Mb	6000	MEWES et al. 1997
1999	<i>Homo sapiens</i>	3,1 Gb	22 000 ^[1]	<i>International Human Genome Sequencing Consortium</i> 2001
2004	<i>Gallus gallus</i>	1 Gb	23 000	<i>International Chicken Genome Sequencing Consortium</i> 2004
2004	<i>Apis mellifera</i>	2 Gb	12 000	<i>Honeybee Genome Sequencing Consortium</i> 2006
2004	<i>Canis familiaris</i>	2,4 Gb	20 000	LINDBLAD-TOH et al. 2005
2006	<i>Bos taurus</i>	2,9 Gb	20 000	<i>Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium</i> 2006
2007	<i>Equus caballus</i>	2,7 Gb	20 000	WADE et al. 2009
2009	<i>Sus scrofa</i>	2,3 Gb	20 000	noch nicht publiziert

[1] Im menschlichen Genom finden sich ähnlich wie in allen anderen Säugergenomen ca. 22 000 proteinkodierende Gene. Dazu kommen noch einmal ca. 10 000 RNA-Gene.

mit bekannten Positionen im Genom auszuwählen. Anschließend wurden diese BAC-Klone jeweils einzeln sequenziert, und erst am Schluss wurde die Genomsequenz aus den Sequenzen der einzelnen BAC-Klone zusammengesetzt. Die Sequenzen der einzelnen BAC-Klone wurden dabei so gewonnen, dass die BAC-Klone in einige Tausend zufällige Plasmidklone subkloniert wurden („shotgun subclones“), deren Inserts jeweils auf beiden Seiten ansequenziert wurden. Die so erzeugten Sequenzen hatten Mitte der 1990er Jahre Leseweiten von ca. 500 bp, und diese steigerten sich in den folgenden Jahren bis auf etwa 900 bp. Die auf diese Weise erzeugten Sequenzen der Plasmidsubklone wurden am Computer zur Gesamtsequenz von etwa 150 kb – 200 kb eines BAC-Klons assembliert. Diese Herangehensweise konnte mit relativ leistungsschwachen Rechnern durchgeführt werden, da immer nur einige Tausend Einzelsequenzen gleichzeitig verglichen werden mussten. Die „clone by clone“-Strategie bietet die Chance, sehr genaue Genomsequenzen mit wenigen Fehlern zu erzeugen. Diese Strategie ist allerdings auch sehr langwierig und sehr teuer. Im Bereich der Haustiere wurde sie für das Schwein eingesetzt. Die Alternative zur „clone by clone“-Strategie ist die sogenannte „whole genome shotgun“-Strategie (WGS). Bei der WGS-Strategie wird das zu sequenzierende Genom direkt in kleine Fragmente subkloniert. Von diesen Subklonen werden viele Millionen an Einzelsequenzen produziert, die dann in einem Schritt wieder zu einer Gesamtsequenz assembliert werden. Dieses Verfahren wurde erstmalig von Craig VENTER für das von der *Celera Corporation* finanzierte humane Genomprojekt eingesetzt (VENTER et al. 2001). Hierbei werden extrem leistungsfähige Rechner benötigt, die die Assemblierung von Millionen von Einzelsequenzen innerhalb vernünftiger Zeiträume bewältigen können. Eine WGS-Assemblierung eines komplexen Genoms stellt aber auch aus biologischen Gründen eine schwierige Aufgabe dar: Einerseits werden beide Allele eines Tieres sequenziert, was zur Folge hat, dass die Assemblierung im Bereich von Unterschieden zwischen den beiden Allelen sehr schwierig werden kann. Andererseits bestehen Säugergenome zu etwa 50 % aus repetitiver DNA. Im menschlichen Genom befinden sich z. B. ca. 50 000 Kopien der soge-

nannten LINE-Sequenz, die etwa 6500 bp lang ist. Wenn man bedenkt, dass eine durchschnittliche Einzelsequenz maximal 900 bp lang ist, wird schnell klar, dass es unmöglich ist, eine Einzelsequenz, die innerhalb einer LINE-Sequenz liegt, eindeutig der richtigen Position in der Genomsequenz zuzuordnen. Dieses Problem wird dadurch gelöst, dass bei einer WGS-Assemblierung zusätzlich die sogenannte „read-pair“-Information ausgenutzt wird (Abb. 1). In der WGS-Sequenzierung mit der Sanger-Technologie werden immer Klone verwendet, deren Insert von beiden Seiten ansequenziert wird, was in zwei Einzelsequenzen oder einem sogenannten „read-pair“ resultiert. Wenn man nun Klone mit genau definierten Insertgrößen verwendet, so genügt es, wenn eine der beiden Einzelsequenzen eindeutig lokalisiert werden kann. Die andere Sequenz kann dann aufgrund der bekannten Insertgröße des sequenzierten Klonen auch dann angeordnet werden, wenn sie vollständig in einem repetitiven Bereich liegt. Dennoch ist bei der WGS-Assemblierung die Gefahr von Assemblierungsfehlern, insbesondere im Bereich von segmentalen Duplikationen, größer als bei der „clone by clone“-Strategie. Dafür ist die WGS-Strategie wesentlich schneller und kostengünstiger als die „clone by clone“-Strategie. Die Genome von Hund und Pferd wurden mit einer reinen WGS-Strategie sequenziert, wobei die Produktion der ca. 30 Millionen Einzelsequenzen jeweils etwa 6 Monate und dann die erste Assemblierung noch einmal jeweils 2 Monate dauerten. Abbildung 1 verdeutlicht die Strategie, die zur Sequenzierung des Pferdegenoms eingesetzt wurde. Für die *De-novo*-Sequenzierung von Säugetieren werden bevorzugt weibliche Tiere ausgewählt, um das X-Chromosom in der gleichen Abdeckung wie die Autosomen zu erhalten. Weiterhin werden bevorzugt ingezüchtete Tiere ausgewählt, um die Unterschiede zwischen den beiden Allelen zu minimieren. Extrem hochrepetitive Bereiche wie das Y-Chromosom können bis heute nur mit der „clone by clone“-Strategie assembliert werden.

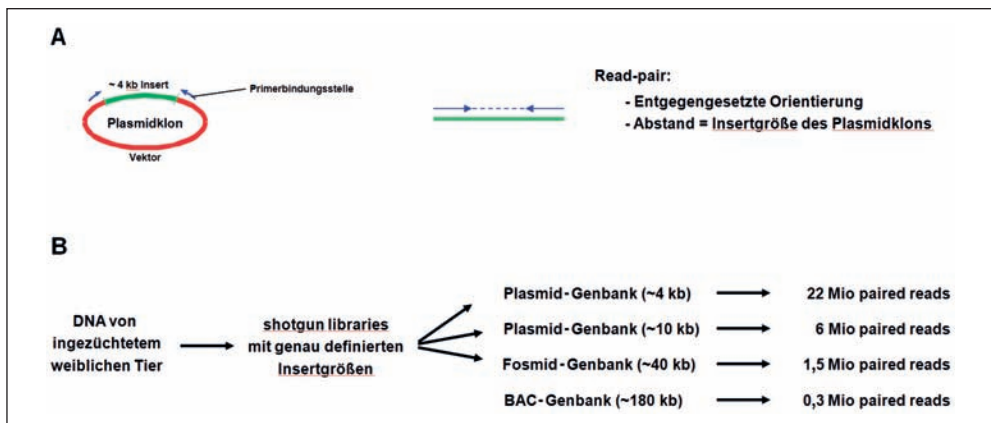


Abb. 1 WGS-Sequenzierung mit Sanger-Technologie. (A) Von jedem Subklon werden zwei Einzelsequenzen, das sogenannte „read pair“ erzeugt. Sofern sich eine der beiden Sequenzen eindeutig assemblieren lässt, kann auch die zweite Sequenz eindeutig zugeordnet werden, selbst wenn sie vollständig repetitiv ist. (B) Strategie zur Sequenzierung des Pferdegenoms. Von der partiell ingezüchteten Vollblutstute Twilight wurden drei verschiedene Genbanken mit genau definierten Insertgrößen angelegt. Zusätzlich wurde eine BAC-Genbank von Bravo, einem Halbbruder von Twilight, für die Sequenzierung verwendet. Durch den Einsatz von Klonen mit sehr unterschiedlichen Insertgrößen konnte eine Genomsequenz mit sehr langen zusammenhängenden Stücken (Contigs) ermittelt werden. Da die Sequenzierung großer Klone wie Fosmide oder BAC-Klone technisch sehr anspruchsvoll ist, werden von diesen Genbanken weniger Klone sequenziert.

3. Qualität von Genomsequenzen

Das menschliche Genom und das Mausgenom liegen heute als sogenannte „finished sequences“, also als nahezu perfekte Genomsequenzen, vor. Alle anderen Säugetiergenome liegen nur als sogenannte „draft sequences“ oder vorläufige Genomsequenzen vor. Im Laufe eines Genomprojekts sind die ersten Assemblierungsschritte zunächst immer vollautomatisch. Am Ende dieser Phase liegen mehr oder weniger lange zusammenhängende Sequenzstücke (*Contigs*) mit entsprechenden Lücken vor. Das Schließen dieser Lücken ist extrem teuer und aufwändig, weshalb man es bis jetzt nur für die Genome von Mensch und Maus durchgeführt hat. Der enorme Aufwand, der gerade für die menschliche Genomsequenz getrieben wird, spiegelt sich in der Tatsache wider, dass seit Februar 2009 die mittlerweile 37. Version der immer wieder verbesserten und vervollständigten humanen Genomsequenz vorliegt. Eine Grundvoraussetzung für eine gute Genomsequenz ist die gleichmäßige Abdeckung des zu sequenzierenden Genoms mit entsprechenden Subklonen. Hierbei muss beachtet werden, dass Sequenzabschnitte mit extrem hohem oder extrem niedrigem GC-Gehalt in den entsprechenden Genbanken häufig unterrepräsentiert sind. Dies hat bei der Sequenzierung der Säugetiergenome dazu geführt, dass insbesondere die CpG-Inseln, die am 5'-Ende von etwa der Hälfte aller Gene liegen, schlecht abgedeckt sind. Gerade bei Säugetieren, für die nur „draft sequences“ vorliegen, kommt es daher überproportional häufig vor, dass Lücken in der Genomsequenz gerade im Bereich der ersten Exons von Genen liegen. Selbst in der qualitativ hervorragenden humanen Genomsequenz gibt es einzelne Gene, die aufgrund von Sequenzierungsfehlern bis heute noch nicht korrekt annotiert sind. Besonders schwierige Sequenzbereiche wie die Zentromere oder die Telomere sind ebenfalls bis heute selbst beim Menschen nicht vollständig sequenziert. Bei den Haustieren mit ihren „draft sequences“ muss man davon ausgehen, dass etwa 30 %–50 % der Gene nicht korrekt sequenziert bzw. annotiert sind. Dies führt zu großen Schwierigkeiten bei Experimenten, bei denen diese Informationen vollautomatisch ausgewertet werden (z. B. in der Systembiologie).

Auf der anderen Seite muss aber natürlich auch festgehalten werden, dass die derzeitig vorhandenen Genomsequenzen der Haustiere trotzdem einen riesigen Fortschritt in der Wissenschaft ermöglicht haben. Obwohl viele Haustiergene im Rahmen der vollautomatischen Genomannotation nicht völlig korrekt identifiziert werden konnten, ist es heute mit menschlicher Interaktion in der Regel möglich, die Fehler für einzelne Gene schnell zu identifizieren und gegebenenfalls vorhandene Lücken in der Genomsequenz zu schließen (DRÖGEMÜLLER et al. 2008). Bei der menschlichen Genomsequenz ist heute die Qualität so gut, dass es weitaus weniger Sequenzierfehler als natürlich vorkommende Polymorphismen gibt. Es ist leicht einzusehen, dass es die „perfekte Genomsequenz“ für eine Spezies gar nicht geben kann, weil das Genom ständigen Veränderungen durch Mutation und Rekombination unterworfen ist. In Zukunft dürfen wir daher eine rasante Zunahme von individuellen Genomsequenzen erwarten, die die Unterschiede zwischen den Individuen (bzw. sogar zwischen den Haplotypen) einer Spezies naturgetreu widerspiegeln. Das ist insbesondere für solche Bereiche des Genoms enorm wichtig, in denen z. B. durch Variation der Kopienzahl eines Sequenzabschnitts tatsächlich die Genausstattung zwischen verschiedenen Individuen schwankt (ALKAN et al. 2009).

4. Erkenntnisse aus den Genomsequenzen der Haustiere

Die Entschlüsselung einiger Haustiergenome hat uns einen sehr guten Überblick über die Genausstattung unserer Haustiere gebracht. Daraus wurde schnell klar, dass alle Säugetiere im Wesentlichen die gleiche Genausstattung mit ca. 20 000 proteinkodierenden Genen besitzen. Unterschiede in der Genausstattung betreffen vor allem große Genfamilien, wie z. B. die Gene für Geruchsrezeptoren oder für die Cytochrom-P450-Enzyme, die für die Metabolisierung von Arzneimitteln eine große Rolle spielen (NIMURA 2009, SCHMITZ et al. 2010). In diesen Genfamilien kommt es zu häufigen Duplikationen und/oder Deletionen von Genen, so dass die Genausstattung zwischen verschiedenen Spezies stark divergiert. Aus der funktionellen Sicht zeichnet sich ab, dass insbesondere Gene mit einer Funktion in der Reproduktion oder Immunabwehr besonders schnell evolvieren und dass diese Gene die größten Unterschiede zwischen den Spezies zeigen (HAASE et al. 2005). Weniger klar ist bis heute die genaue Anzahl an RNA-kodierenden Genen, die auf etwa 10 000 für Säugetiere geschätzt wird. Es wird vermutet, dass die phänotypischen Unterschiede zwischen den Spezies nicht allein durch die Genausstattung, sondern in starkem Maße durch unterschiedliche Regulationsmechanismen der Genexpression bedingt werden.

Im Rahmen der bisher durchgeführten Genomsequenzierungsprojekte bei Haustieren wurde gleichzeitig die innerartliche Variabilität der Genomsequenzen untersucht. Dafür wurden zufällige Sequenzdaten von einzelnen Tieren verschiedener Rassen erzeugt und mit der Genomsequenz verglichen. Dies führte u. a. zur Identifizierung von mehr als einer Million Einzelbasenaustausche (SNPs) für Hund, Rind, Pferd und Schwein. Die Forschung konzentrierte sich bisher vor allem deshalb auf die SNPs, weil diese im Labor sehr effizient und kostengünstig genotypisiert werden können. Bei den sequenzierten Haussäugetieren zeigte sich, dass ein großer Teil der identifizierten SNPs über die Rassegrenzen hinweg variabel ist und somit alte Polymorphismen repräsentiert, die bereits vor der Trennung der heutigen Rassen existierten. Die meisten heutigen Haustierrassen wurden in den letzten 250 Jahren gegründet. In der Regel stellen sie geschlossene Populationen dar, die mit einer relativ kleinen Anzahl von Tieren gegründet wurden und in die heute keine Tiere mehr von außen eingekreuzt werden. Diese spezielle Populationsstruktur führt dazu, dass das Kopplungsungleichgewicht (engl. *linkage disequilibrium*, LD) innerhalb von Rassen etwa 1 Mb reicht, also wesentlich weiter ist als in typischen menschlichen Populationen. Dagegen ist das LD zwischen den Rassen wesentlich kürzer und reicht dort nur etwa 10 kb bis 100 kb weit (GEORGES 2007).

SNPs können mit Hilfe von *Mikroarrays* sehr effizient genotypisiert werden. Da es hierfür vielfältige Anwendungen gibt, wurden solche SNP-Genotypisierungsmikroarrays für alle sequenzierten Haustiere entwickelt (Tab. 2). Mit dieser Technologie lassen sich Tausende bis Hundertausende SNPs für etwa 100–200 Euro genotypisieren. Daraus ergeben sich vielfältige Anwendungen in der Tierzucht und Veterinärmedizin, wie z. B. eine sehr sichere Identitätskontrolle, die Kartierung von merkmalsassoziierten Genomregionen oder die genom-basierte Zuchtwertschätzung.

5. Ausblick

Während noch vor fünfzehn Jahren kaum ein Tiergenetiker davon zu träumen wagte, dass die Genomsequenz eines Haustiers jemals verfügbar werden würde, stehen uns heute eine Reihe

Tab. 2 Mikroarrays für die SNP-Genotypisierung bei Haustieren

Spezies	SNPs	Anbieter
Hund	20 000	illumina
	50 000	Affymetrix
	170 000	illumina
Rind	50 000	illumina
	777 000	illumina
Pferd	50 000	illumina
Schwein	60 000	illumina
Schaf	50 000	illumina

von Genomsequenzen für unsere Haustiere zur Verfügung. Durch die Entwicklungen in der Sequenzieretechnologie ist abzusehen, dass die Sequenzierung von Haustieren in großem Stile technisch realisierbar sein wird. Obwohl die Hochdurchsatz-Genotypisierung von SNPs erst seit wenigen Jahren machbar ist und bereits zu vielen wichtige Erkenntnissen geführt hat, gehen viele Wissenschaftler davon aus, dass diese Technologie schon in einigen Jahren wieder durch die vollständige Sequenzierung der Probanden abgelöst werden könnte. Die Entschlüsselung der Basenabfolge eines Individuums ist bereits heute machbar und wird für wertvolle Zuchttiere tatsächlich durchgeführt. Dabei werden sehr große Datenmengen erzeugt, deren Analyse und Verarbeitung extrem leistungsfähige Rechner und Programme benötigt. In Zukunft werden DNA-Variationen zwischen verschiedenen Zellen eines Individuums (z. B. Tumor *versus* normal), aber natürlich auch epigenetische Phänomene (DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen) verstärkt untersucht werden. Die wohl entscheidende wissenschaftliche Herausforderung liegt allerdings darin, die funktionellen Auswirkungen von Veränderungen an der DNA-Sequenz zu verstehen. Im Moment beschränkt sich der Hauptschwerpunkt der Forschung noch auf die additiven Genwirkungen, während Analysen von Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen nach wie vor äußerst schwierig bleiben.

Literatur

- ALKAN, C., KIDD, J. M., MARQUES-BONET, T., AKSAY, G., ANTONACCI, F., HORMOZDIARI, F., KITZMAN, J. O., BAKER, C., MALIG, M., MUTLU, O., SAHINALP, S. C., GIBBS, R. A., and EICHLER, E. E.: Personalized copy number and segmental duplication maps using next-generation sequencing. *Nature Genet.* **41**, 1061–1067 (2009)
- Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, ELSIK, C. G., TELLAM, R. L., WORLEY, K. C., GIBBS, R. A., et al.: The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* **324**, 522–528 (2009)
- DRÖGEMÜLLER, C., KARLSSON, E. K., HYTÖNEN, M. K., PERLOSKI, M., DOLF, G., SAINIO, K., LOHI, H., LINDBLAD-TOH, K., and LEEB, T.: A mutation in hairless dogs implicates FOXI3 in ectodermal development. *Science* **321**, 1462 (2008)
- EDHARD, G., MILAN, D., YERLE, M., LAHBIB-MANSAIS, Y., and GELLIN, J.: The gene map of the pig (*Sus scrofa domestica* L.): a review. *Cytogenet. Cell Genet.* **61**, 146–151 (1992)
- ELLEGREN, H., CHOWDHARY, B. P., JOHANSSON, M., MARKLUND, L., FREDHOLM, M., GUSTAVSSON, I., and ANDERSSON, L.: A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics* **137**, 1089–1100 (1994)
- FLEISCHMANN, R. D., ADAMS, M. D., WHITE, O., CLAYTON, R. A., KIRKNESS, E. F., et al.: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496–512 (1995)

- GEORGES, M.: Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8, 131–162 (2007)
- GOUREAU, A., YERLE, M., SCHMITZ, A., RIQUET, J., MILAN, D., PINTON, P., FRELAT, G., and GELLIN, J.: Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. *Genomics* 36, 252–262 (1996)
- GREEN, E. D.: Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Nature Rev. Genet.* 2, 573–583 (2001)
- HAASE, B., SCHLÖTTERER, C., HUNDRIESER, M. E., KUIPER, H., DISTL, O., TÖPFER-PETERSEN, E., and LEEB, T.: Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene* 352, 20–29 (2005)
- Honeybee Genome Sequencing Consortium*: Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949 (2006)
- International Chicken Genome Sequencing Consortium*: Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432, 695–716 (2004)
- International Human Genome Sequencing Consortium*: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921 (2001)
- LEE, T., VOGL, C., ZHU, B., JONG, P. J. DE, BINNS, M. M., CHOWDHARY, B. P., SCHARFE, M., JAREK, M., NORDSIEK, G., SCHRADER, F., and BLÖCKER, H.: A human-horse comparative map based on equine BAC end sequences. *Genomics* 87, 772–776 (2006)
- LINDBLAD-TOH, K., WADE, C. M., MIKKELSEN, T. S., KARLSSON, E. K., JAFFE, D. B., et al.: Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803–819 (2005)
- MEWES, H. W., ALBERMANN, K., BÄHR, M., FRISHMAN, D., GLEISSNER, A., HANI, J., HEUMANN, K., KLEINE, K., MAIERL, A., OLIVER, S. G., PFEIFFER, F., and ZOLLNER, A.: Overview of the yeast genome. *Nature* 387, 7–65 (1997)
- NIIMURA, Y.: Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates: interaction between environments and genomic contents. *Hum. Genomics* 4, 107–118 (2009)
- OLIVER, S. G., VAN DER AART, Q. J., AGOSTONI-CARBONE, M. L., AIGLE, M., ALBERGHINA, L., et al.: The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature* 357, 38–46 (1992)
- RAUDSEPP, T., GUSTAFSON-SEABURY, A., DURKIN, K., WAGNER, M. L., GOH, G., et al.: A 4,103 marker integrated physical and comparative map of the horse genome. *Cytogenet. Genome Res.* 122, 28–36 (2008)
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., and ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491 (1988)
- SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467 (1977)
- SCHMITZ, A., DEMMEL, S., PETERS, L. M., LEEB, T., MEVISSSEN, M., and HAASE, B.: Comparative human-horse sequence analysis of the CYP3A subfamily gene cluster. *Anim. Genet.* (eingereicht, 2010)
- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., et al.: The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351 (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, 865–867 (2009)

Prof. Dr. Tosso LEEB
 Institut für Genetik
 Vetsuisse-Fakultät
 Universität Bern
 Bremgartenstrasse 109a
 3001 Bern
 Schweiz
 Tel.: +41 31 6312326
 Fax: +41 31 631 2640
 E-Mail: Tosso.Leeb@itz.unibe.ch

Stand der funktionalen Genomanalyse bei Nutztieren Nutzung von Mikroarray-Analysen in der molekularen Tierzucht

Klaus WIMMERS (Dummerstorf)

Mit 1 Abbildung

Zusammenfassung

Holistische Ansätze zur Analyse des Genoms hinsichtlich seiner Struktur und Funktion zur Definition und Charakterisierung des genetischen Make-ups eines Organismus machen die Disziplin „Genomik“ aus. Die „Funktionale Genomik“ betrachtet insbesondere die Gesamtheit der Genprodukte, das Transkriptom und Proteom, sowie deren Interaktion und Regulation und somit Mechanismen der Merkmalsausprägung, um zum Verständnis der biologischen Funktion von Sets von Genen beizutragen. Mikroarrays stellen derzeit das gebräuchlichste und mächtigste Werkzeug der funktionalen Genomanalyse dar. Schwerpunkte der Anwendung von Mikroarrays beim Nutztier sind Untersuchungen zur Ontogenese, Immunantwort und Wirt-Pathogen-Interaktion, Reproduktion und Wachstum. Mikroarray-Analysen ermöglichen die Darstellung von funktionalen Netzwerken, Geninteraktion sowie simultaner und koordinierter Regulation von Genen in Abhängigkeit von Phänotyp, Genotyp, Alter und/oder Behandlung. Hinsichtlich der Identifizierung von Kandidatengenien liefern Mikroarray-Experimente, ähnlich wie QTL-Analysen, umfangreiche Genlisten, die einer weiteren Priorisierung bedürfen. Die Integration von kartenbasierten Kopplungs- und funktionsorientierten Expressionsanalysen ermöglicht, die Relevanz von Genen für die Merkmalsausprägung und Vererbung experimentell zu evaluieren. Die Kartierung von Genen und sogenannten Expressions-QTL (eQTL) ermöglicht die Differenzierung von cis- und trans-Kontrolle der Expression. Dabei legt die Diagnose der cis-Kontrolle eines Gens nahe, dass Polymorphismen im Gen vorhanden sind, die ursächlich dessen Expression bestimmen. Mit den Ansätzen der genetischen Genomik wird so ein Zusammenhang zwischen der Variation auf der Ebene der RNA und DNA erstellt. Hier werden Ansätze der funktionalen und genetischen Genomik in den Nutztierwissenschaften diskutiert.

Abstract

Genomics is a recent scientific discipline that strives to define and characterize the complete genetic make-up of an organism by holistic analyses. Functional genomics particularly focuses on gene products, the transcriptome and the proteome, and their interaction and regulation in order to provide insight into mechanisms of trait expression and the biological function of sets of genes. Microarrays are currently the most commonly used and powerful tool of functional genomics. Most applications of microarray in animal science address ontogenesis, immune response, host-pathogen-interaction, reproduction and growth. Microarray provide functional networks and display gene interaction, simultaneous and coordinated regulation of expression depending on the phenotype, genotype, state, or treatment. Regarding the identification of candidate genes microarray experiments provide lists of genes, similar to QTL-experiments that require further prioritization of genes. The integration of map based and function driven analyses allow evaluating the relevance of genes for the trait of interest. Mapping of genes and so-called expression QTL (eQTL) reveals a discrimination of cis- and trans-control of expression. Cis-control of a gene indicates that polymorphisms within itself are causal for variation of its expression. By this genetical genomics connects variation at the level of RNA expression to variation at the level of DNA. Here applications of microarrays in functional and genetical genomics in farm animal breeding are discussed.

1. Einleitung und Motivation

Verbesserungen in Haltung, Ernährung und Zucht haben in den vergangenen Jahrzehnten die Leistungsfähigkeit unserer Nutztiere deutlich erhöht. Seit rund 30 Jahren bedient sich die Tierzucht dabei auch DNA-Tests (MHS-Test, FUJII et al. 1991). In der molekularen Tierzucht werden verschiedene Strategien verwendet, um Gene zu ermitteln, die quantitative Merkmale steuern. Aus der Kenntnis über die Physiologie der Merkmale lassen sich direkte biologische Kandidatengene ableiten. Kopplungsanalysen sind hypothesenfreie Ansätze, die die Betrachtung jedes variablen, vererblichen Merkmals ohne Wissen seiner Physiologie erlauben und bei denen die Kosegregation von über das Genom verstreuten DNA-Markern und Merkmalen beobachtet wird, um sogenannte quantitative *Trait Loci*, QTL, zu kartieren. Erstmals haben ANDERSSON et al. (1994) über eine QTL-Analyse beim Nutztier berichtet. Über die Vielzahl der nun bekannten QTL gibt die „AnimalQTLdb“ Auskunft ([http://www. Animalgenome. org/ QTLdb/](http://www.Animalgenome.org/QTLdb/), HU et al. 2007). QTL-Regionen sind im Allgemeinen einige Centimorgan (cM) groß und enthalten viele Gene, deren positionelle Klonierung aufwändig ist und bisher nur in wenigen Beispielen erfolgreich war, wie etwa die Identifizierung von PRKAG3 und IGF2 als ursächlich für Variation von Fleisch- und Wachstumsmerkmalen beim Schwein (MILAN et al. 2000, CIOBANU et al. 2001, GEORGES et al. 2003, VAN LAERE et al. 2003), DGAT beim Rind für Milchleistungsmerkmale (GRISART et al. 2002, KÜHN et al. 2004), oder Myostatin (GDF8) bei Schafen für Muskelwachstum (CLOP et al. 2006).

Ende der 1990er Jahre wurden beim Nutztier sogenannte EST, *Expressed Sequence Tags*, identifiziert und kartiert (ADAMS et al. 1993, FRIDOLFSSON et al. 1997, PONSUKSILI et al. 2001). Dieser Fokus auf exprimierte Genomabschnitte trug zur Entwicklung der Genomkarten der Nutztiere entscheidend bei und war auch Grundlage für die Entwicklung von Techniken und Methoden zur Erstellung von Expressionsprofilen und zur Darstellung der differentiellen Genexpression.

Neue Methoden zur Expressionsprofilierung, insbesondere die Einführung von Mikroarray-Analysen, die Anfänge der Sequenzierung ganzer Genome, die Genomkartierung und die genomweiten Kopplungsanalysen als holistische Ansätze bedeuteten den Beginn der Genomik. Der Begriff wurde 1987 mit der Auflage der Zeitschrift *Genomics* von MCKUSICK, RUDDLE und RODERICK geprägt (MCKUSICK und RUDDLE 1997). Dabei meint Genomik die Anwendung von holistischen Ansätzen zur Analyse des Genoms hinsichtlich seiner Struktur und Funktion zur Definition und Charakterisierung des genetischen Make-ups eines Organismus. Dies umfasst die Aufklärung der gesamten Sequenz und Struktur des Genoms und die Annotation von Genen sowie die Aufklärung der Struktur, Funktion und Abundanz aller Transkripte (modifiziert aus *Genetics Encyclopedia*). Während strukturelle Genomik auf die Sequenzinformation, Kartierung und Variation auf der Ebene der DNA fokussiert und den Zusammenhang zu Phänotypen und deren Vererbung zur Klärung der genetischen Steuerung der phänotypischen Variation beleuchtet, betrachtete die funktionale Genomik insbesondere die Gesamtheit der Genprodukte, das Transkriptom und Proteom, sowie deren Interaktion und Regulation und somit Mechanismen der Merkmalsausprägung, um zum Verständnis der biologischen Funktion von Sets von Genen beizutragen.

Die Suffixes „ome“ und „omics“ werden mittlerweile vielfach gebraucht und sind in der Biologie ein Hinweis auf die Betrachtung der Gesamtheit einer Klasse von bestimmten Komponenten und/oder Mechanismen bzw. auf integrative Ansätze zu Analyse dieser.

In diesem Beitrag werden Grundlagen, Entwicklung und Perspektiven der Anwendung von Mikroarrays – als einem der gebräuchlichsten und derzeit mächtigsten Werkzeuge der funktionalen Genomanalyse, speziell der Transkriptomik – bei Nutztieren reflektiert werden.

2. Grundlagen und Optionen

Holistische Genexpressionsanalysen ermöglichen die Darstellung von funktionalen Netzwerken, Geninteraktionen sowie simultaner und koordinierter Regulation von Genen in Abhängigkeit von Phänotyp, Genotyp, Alter und/oder Behandlung. Die Durchführung von holistischen Expressionsanalysen erfordert zumindest fundierte Vermutungen hinsichtlich der Auswahl von Zellen/Geweben und deren Behandlungs-/Entwicklungszustand, um Ergebnisse zu gewährleisten, die neue Hypothesen zur genetischen Steuerung der betrachteten Merkmale ermöglichen.

Zur Erstellung von Expressionsprofilen stehen offene Systeme zur Verfügung, wie Differential-Display-RT-PCR (LIANG und PARDEE 1992), *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) (VELCULESCU et al. 1995) oder subtraktive Hybridisierung (DIATCHENKO et al. 1996), die theoretisch erlauben, alle Transkripte zu erfassen. Dem gegenüber stellen Mikroarrays geschlossene Systeme da, die ausschließlich die Analyse der jeweils repräsentierten Sonden erlauben (SCHENA et al. 1995).

Mikroarrays erlauben die simultane Analyse vieler tausender Transkripte. Dabei sind Mikroarrays zu unterscheiden, deren Sonden cDNA-Fragmente (PCR amplifiziert oder kloniert) oder synthetisch hergestellte Oligonukleotide (≥ 22 nt, herstellersistezifisch) sind. Bei der Herstellung von Mikroarrays werden die Sondenmoleküle in Rastern auf eine Fläche von ca. 1 cm² gedruckt oder im Falle von Oligonukleotiden auch unmittelbar auf der Arrayoberfläche synthetisiert. Oligonukleotid-Mikroarrays erlauben eine höhere Dichte an Molekülen im Testfeld als cDNA-Mikroarrays und die Auswahl informativer Sequenzbereiche, allerdings unter der Prämisse guter Kenntnisse über die Transkripte der entsprechenden Spezies, während cDNA-Mikroarrays auch bei geringer Kenntnis über die Gene, sogar mit anonymen Fragmenten, hergestellt werden können.

Für Nutztiere stehen eine Reihe von „genomweiten“, also die große Mehrheit der bekannten Transkripte repräsentierende, Mikroarrays zur Verfügung: cDNA-Mikroarrays, die aus cDNA-Bibliotheken verschiedener Gewebe und Zellen abgeleitet wurden, sind z. B. für Huhn (13 k), Rind (20 k) und Schwein (22 k) verfügbar (ARK-Genomics; <http://www.ark-genomics.org/microarrays/bySpecies/>). Daneben bieten die Firmen Agilent (Agilent Technologies; <http://www.genomics.agilent.com/homepage.aspx>) und Affymetrix (Affymetrix Gene Arrays, Affymetrix, Inc; <http://www.affymetrix.com/estore/>) Oligonukleotid-Mikroarrays u. a. für Rind, Schwein, Huhn, Pferd und Schaf an. Des Weiteren gibt es für Schwein, Rind und Huhn genomweite Konsortien-Mikroarrays. Darüber hinaus sind eine Reihe von projektspezifischen Mikroarrays entwickelt worden. Letztere sind in der Regel cDNA-Mikroarrays, die spezifische Transkripte repräsentieren.

Zur Durchführung von Mikroarray-Experimenten gilt es zunächst „Ziel-RNAs“ (*targets*) zu isolieren, d. h. die das experimentelle Design bestimmende Auswahl an Zielgeweben und Probenmaterial zu treffen. Die RNAs werden farbmarkiert und anschließend auf das Testfeld der Mikroarray inkubiert, wo dann die Hybridisierung der markierten Ziel-RNAs mit den auf der Arrayoberfläche fixierten „Sonden“ (*probes*) erfolgt. Dabei sind Systeme gebräuchlich,

bei denen zwei unterschiedlich farbmarkierte Ziel-RNAs auf einen Mikroarray hybridisiert werden oder im Einfarbsystem eine RNA auf einen Array. Anschließend wird nach einigen Waschschritten die Intensität der Arraypositionen mit Laserscannern erfasst, für die Komplementarität zwischen Sonden und Ziel-RNAs besteht. Dabei erfolgt im Zweifarbsystem eine Differenzierung der Signale der alternativ markierten Ziel-RNAs. Die Auswertung umfasst dabei die Anwendung verschiedener Algorithmen zur Hintergrundkorrektur und Normalisierung. Erforderlich sind weiter umfangreiche biostatistische und bioinformatische Analysen zur Extraktion und Systematisierung der aus tausenden von Einzeldaten bestehenden Informationen, um die biologische Interpretation zu unterstützen.

Holistische Analysen des Transkriptoms dienen vor allem dazu, merkmalsrelevante Reaktions- und Signalwege zu identifizieren. Hinsichtlich der Identifizierung von Kandidatengen liefern sie, ähnlich wie QTL-Analysen, umfangreiche Genlisten, die einer weiteren Priorisierung bedürfen (WIMMERS et al. 2010b).

3. Anwendung und Strategien

Nachfolgend werden exemplarisch Anwendungen der Mikroarray-Technik in der Nutztierforschung vorgestellt. Mit Blick auf das Ziel, DNA-Marker für die Selektion in der Nutztierzucht abzuleiten, werden Strategien zur Integration von kartenbasierten Kopplungsanalysen und den funktionsorientierten Expressionsanalysen erläutert.

In der GEO (*gene expression omnibus*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)-Datenbank sind Daten aus Mikroarray-Experimenten abgelegt. Dort finden sich derzeit (Stand März 2010) für Rind, Huhn, Schwein, Schaf, Pferd und Hund 184, 162, 148, 13, 12 bzw. 62 Experimente verzeichnet. Die Mehrzahl der Experimente befasst sich mit der Immunantwort bei Infektionen und der Wirt-Pathogen-Interaktion. Weiter sind zahlreiche Experimente zu Fruchtbarkeits- und Reproduktionsmerkmale sowie zu Muskel/Fleischleistung und Wachstum verzeichnet.

Vor dem Hintergrund, dass während der Myogenese die Anzahl Muskelfasern und die Muskelfasertypverteilung weitgehend determiniert werden und diese wichtig sind für postnatalen Muskelansatz und Fleischqualitätsmerkmale, wurden Expressionsprofile von *M. longissimus* zu sieben pränatalen Entwicklungsstadien von Duroc- und Pietrain-Schweinen mit applikationsspezifischen cDNA-Mikroarrays erstellt (CAGNAZZO et al. 2006, TE PAS et al. 2005). Die Analysen zeigten eine koordinierte Expression von Genen aus energieliefernden Stoffwechselwegen einerseits und Differenzierungs- und Proliferationssignalwegen andererseits. Unter anderem konnten diese Analysen zeigen, dass die Muskelfaserbildung bei Duroc früher initiiert wird als in Pietrain, was ursächlich an phänotypischen Unterschieden der Rassen in Merkmalen des Muskelansatzes und der Fleischqualität beteiligt sein könnte (CAGNAZZO et al. 2006, TE PAS et al. 2005).

Bei der vergleichenden Analyse von Leberexpressionsprofilen zu drei pränatalen Zeitpunkten bei Tieren der Rasse Deutsche Landrasse und Pietrain unter Verwendung eines 13k-Oligonukleotid-Mikroarrays (Qiagen-NRSP8) konnten in ähnlicher Weise Unterschiede in der pränatalen Expression von Genen, vor allem aus dem Fettintermediärstoffwechsel sowie Proliferations- und Zellwachstumssignalen, aufgezeigt werden, die postnatale Rassenunterschiede widerspiegeln. Pietrain tendieren schon pränatal zu höherer Expression von Genen für Zell-/Gewebsentwicklung, während Feten der Rasse Deutsche Landrasse zu höherer Expression von Genen für intrazellulären Energie- und Stoffumsatz tendieren (PONSUKSILI et al.

2007). Die Autoren stellen für die Rassen differenziell regulierte funktionelle Netzwerke dar und verweisen auf Kandidatengene für Merkmale des Fett- bzw. Muskelansatzes aus diesen Netzwerken (PONSUKSILI et al. 2007).

Da bei der Analyse von Expressionsprofilen zu pränatalen Entwicklungsstadien individuelle Phänotypen der untersuchten Tiere von züchterisch relevanten Merkmalen nicht vorliegen, stellen diese Untersuchungen den Zusammenhang zu diesen Merkmalen über die Untersuchungen merkmalsdivergenter Rassen her (WIMMERS et al. 2010c).

Analysen von Expressionsprofilen zum Zeitpunkt der Merkmalsausprägung ermöglichen die direkte Bezugnahme auf den individuellen Phänotyp und die entsprechende Auswahl von Tieren. So konnten bei der Untersuchung der merkmalsabhängigen Expression im *M. longissimus* von 74 F2-Tieren einer Kreuzung aus Duroc und Pietrain (DuPi-Population) mit genomweiten Affymetrix-Mikroarrays (Affymetrix GeneChip Porcine Genome Array) 1108 bzw. 1114 Gene identifiziert werden, deren Expressionsniveau mit Hauptkomponenten korreliert, die einen hohen Anteil der Variation in Merkmalen des Wasserbindungsvermögens von Fleisch erklären (PONSUKSILI et al. 2009). Unmittelbar mit der Ausprägung des Merkmals Drip korrelieren dabei 1279 Gene (PONSUKSILI et al. 2008a). Auch die alternative Analyse von diskordanten Geschwisterpaaren (sechs diskordante Geschwisterpaare für das Merkmal Drip) aus der DuPi-Population liefert eine umfangreiche Liste von 789 Genen, die merkmalsabhängig reguliert sind (PONSUKSILI et al. 2008b). Die bioinformatische Analyse der Genlisten erlaubt es, Stoffwechselwege und funktionelle Netzwerke von Genen anzusprechen, die für die Merkmalsausprägung relevant sind.

Dabei ist die Unterscheidung von Ursache und Wirkung bei der Feststellung differenzieller Expression problematisch, d. h., die Expressionsprofile geben nicht Auskunft, für welche Gene eine differenzielle Expression unmittelbar ursächlich für Merkmalsvariation verantwortlich ist und welche Gene mittelbar reguliert sind. Gleichzeitig verdeutlichen die Umfänge der Genlisten, dass die konkrete Benennung und Rangfolge von Kandidatengenen hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung für züchterisch wichtige Merkmale schwierig ist.

Die Integration von kartenbasierten Kopplungs- und funktionsorientierten Expressionsanalysen ermöglicht es, die Relevanz von Genen für die Merkmalsausprägung und Vererbung experimentell zu evaluieren. Die Projektion der Lokalisation merkmalsabhängig differenziell exprimierter Gene auf QTL-Karten für das entsprechende Merkmal stellen einen ersten Schritt in der Zusammenführung von Informationen aus QTL- und Expressionsanalysen dar. So wurden z. B. Gene, die sich in einem Experiment mit einem 5k-cDNA-Array während der Immunantwort auf eine Marek-Infektion bei Hühnerlinien mit divergenter Marek-Resistenz als different exprimiert erwiesen, in zuvor identifizierten QTL-Regionen für Marek-Resistenz kartiert (LIU et al. 2001). In einem eigenen Experiment wurden für zwei QTL-Regionen für das Merkmal Drip jeweils BAC-Contigs erstellt und zur Konstruktion von QTL-Region-spezifischen BAC-Arrays genutzt. Die Hybridisierung dieser mit *M. longissimus*-RNA von Tieren mit unterschiedlicher Merkmalsausprägung und Tieren mit unterschiedlichen Genotypen an den QTL ermöglichte es, einzelne BACs und über vergleichende Kartierung Gene anzusprechen, die positionelle, funktionelle Kandidatengene darstellen (WIMMERS et al. 2010c). Dieser Ansatz stellt einen Zusammenhang zwischen der physischen Karte, der genetischen QTL-Karte und der Genexpression her und umfasst im Gegensatz zu kommerziellen genomweiten Mikroarrays alle Transkripte der betrachteten QTL-Region.

Das Konzept der „genetical genomics“ wurde 2001 von JANSEN und NAP (2001) vorgeschlagen und sieht die Behandlung von Daten zum Expressionsniveau verschiedener Gene

als phänotypische Merkmale in Kopplungsanalysen zur Kartierung von Genomabschnitten, die die Transkriptabundanz steuern, sogenannten Expressions-QTL, eQTL, vor (JANSEN und NAP 2001). Die Kartierung von Genen und eQTL ermöglicht die Differenzierung von cis- und trans-Kontrolle der Expression. Dabei legt die Diagnose der cis-Kontrolle eines Gens nahe, dass Polymorphismen im Gen vorhanden sind, die ursächlich dessen Expression bestimmen. Mit den Ansätzen der „genetischen Genomik“ wird so ein Zusammenhang zwischen der Variation auf der Ebene der RNA und DNA erstellt. Beim Nutztier werden derzeit eQTL-Analysen durchgeführt, die dazu beitragen, innerhalb von Expressionsprofilen Ursache und Wirkung zu unterscheiden und Kandidatengene zu rangieren. Wie oben erwähnt, wurden in der DuPi-Population 1279 Gene detektiert, die mit dem Merkmal Drip korreliert exprimiert sind. Für die Expressionsniveaus dieser Gene bei 74 Tieren wurden QTL, also eQTL, geschätzt. Dabei wurden insgesamt 897 eQTL gefunden, von denen 108 in QTL-Regionen für das Merkmal Drip kartierten. Von diesen erwiesen sich 8 als cis-reguliert, d. h., die Gene und ihre korrespondierenden eQTL kartieren im selben Markerintervall (PONSUKSILI et al. 2008a). Damit stellen diese acht Gene positionelle funktionelle Kandidatengene dar, für die experimentelle Evidenz für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen genetischer und phänotypischer Variation besteht. Nachfolgende eQTL-Analysen, basierend auf Echtzeit-PCR-Daten eines umfangreicheren Tiermaterials (n=276 DuPi) sowie Assoziationsstudien in

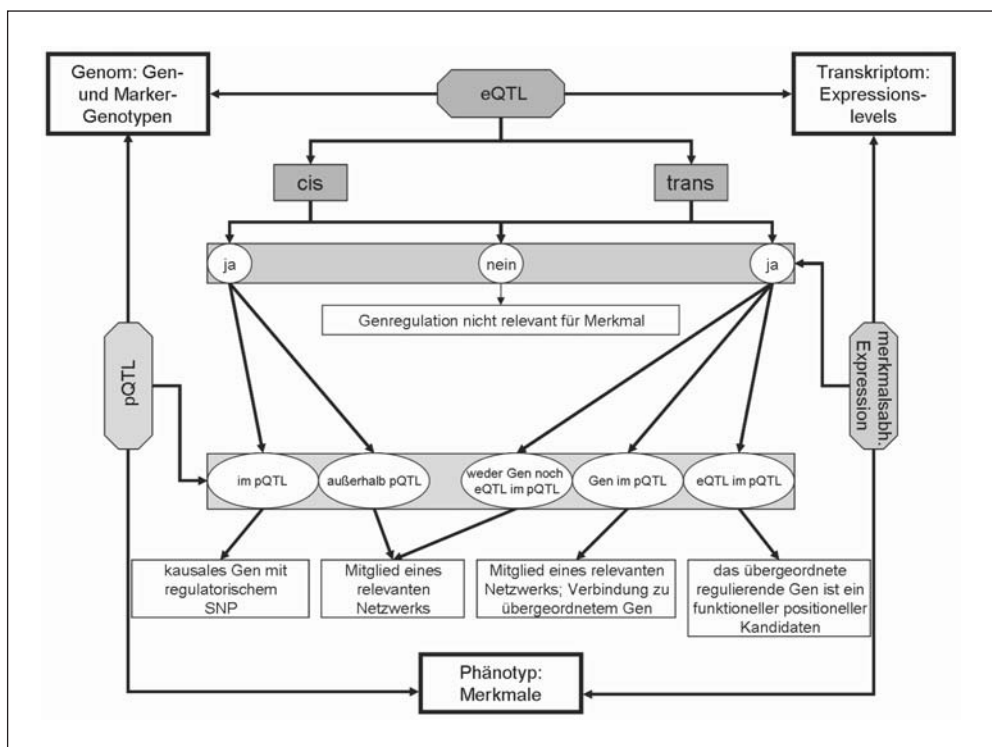


Abb. 1 Diagramm zur Integration von Daten aus eQTL-, pQTL- sowie Expressionsanalysen zur Identifizierung von Kandidatengenen für quantitative Merkmale (modifiziert aus WIMMERS et al. 2010a)

kommerziellen Herden, unterstreichen den Kandidatengencharakter dieser Loci (PONSUKSILI et al. 2010, SRIKANCHAI et al. 2010a, b).

Die Integration von phänotypischen Daten, Genotypen und Expressionsprofilen erlaubt die Schätzung von QTL für die Expressionsniveaus einer Vielzahl von Transkripten (eQTL) sowie für züchterisch wichtige Merkmale (pQTL) und die Identifizierung merkmalsabhängig differenziell exprimierter Gene. Diese Informationen tragen gemeinsam zur experimentellen Priorisierung von positionellen funktionellen Kandidatengen bei (Abb. 1, WIMMERS et al. 2010a).

4. Implikationen und Perspektiven

Die Methoden der funktionalen Genomik geben Einblicke in die Regulation der biologischen Prozesse der Merkmalsausprägung durch die Darstellung von phänotyp- oder genotypabhängigen Expressionsprofilen, der Modulation der Expressionsmuster als Antwort auf exogene Stimulation sowie der Genregulation entlang der ontogenetischen Entwicklung. Hierbei liefern Mikroarrays funktionelle Netzwerke (biochemische/physiologische Reaktionswege, koordinierte Expression, Genotyp-Umwelt-Interaktion), die zur Identifikation von funktionellen Kandidatengen für tierzüchterisch wichtige Merkmale beitragen. Die holistischen Analysen erlauben, neue Hypothesen zur genetischen Steuerung der Merkmalsausprägung und -vererbung abzuleiten. Nachfolgende fokussierte Analysen dienen der Validierung der Hypothesen. Genetische Genomik liefert zusätzlich regulatorische Netzwerke. Die eQTL-Kartierung verbindet Variation auf der Ebene der RNA-Expression mit Variation auf der Ebene der DNA. Die Verfügbarkeit von genomweiten SNP-Mikroarrays wird erlauben, auch für Expressionsphänotypen genomweite Assoziationsanalysen durchzuführen und eQTL feiner zu kartieren. Die neuen Sequenzieretechniken (*next generation sequencing*) werden die Analyse des Transkriptoms vor allem dahingehend verbessern, dass alle vorhandenen Transkripte detektiert und quantifiziert werden können.

Literatur

- ADAMS, M. D., SOARES, M. B., KERLAVAGE, A. R., FIELDS, C., and VENTER, J. C.: Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature Genet.* 4, 373–380 (1993)
- 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)
- CAGNAZZO, M., TE PAS, M. F., PRIEM, J., WIT, A. A. DE, POOL, M. H., DAVOLI, R., and RUSSO, V.: Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of two pig breeds differing in muscle characteristics. *J. Animal Science* 84, 1–10 (2006)
- CIOBANU, D., BASTIAANSEN, J., MALEK, M., HELM, J., WOOLLARD, J., PLASTOW, G., and ROTHSCCHILD, M.: Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma(3)-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics* 159, 1151–1162 (2001)
- CLOP, A., MARCO, F., TAKEDA, H., PIROTTIN, D., TORDOIR, X., BIBÉ, B., BOUIX, J., CAIMENT, F., ELSÉN, J. M., EYCHENNE, F., LARZUL, C., LAVILLE, E., MEISH, F., MILENKOVIC, D., TOBIN, J., CHARLIER, C., and GEORGES, M.: A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genet.* 38, 813–818 (2006)
- DIATCHENKO, L., LAU, Y. F., CAMPBELL, A. P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAVA, N., SYERDLOV, E. D., and SIEBERT, P. D.: Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6025–6030 (1996)

- DOERGE, R. W.: Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Rev. Genet.* 3, 43–52 (2002)
- FRIDOLFSSON, A. K., HORI, T., WINTERO, A. K., FREDHOLM, M., YERLE, M., ROBIC, A., ANDERSSON, L., and ELLEGREN, H.: Expansion of the pig comparative map by expressed sequence tags (EST) mapping. *Mammalian Genome* 8, 907–912 (1997)
- FUJII, J., OTSU, K., ZORZATO, F., LEON, S. DE, KHANNA, V. K., WEILER, J. E., O'BRIEN, P. J., and MACLENNAN, D. H.: Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253, 448–451 (1991)
- GEORGES, M., and ANDERSSON, L.: Positional identification of structural and regulatory quantitative trait nucleotides in domestic animal species. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 68, 179–187 (2003)
- GRISART, B., COPPIETERS, W., FARNIR, F., KARIM, L., FORD, C., BERZI, P., CAMBISANO, N., MNI, M., REID, S., SIMON, P., SPELMAN, R., GEORGES, M., and SNELL, R.: Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* 12, 222–231 (2002)
- HU, Z., FRITZ, E. R., and REECY, J. M.: AnimalQTLdb: a livestock QTL database tool set for positional QTL information mining and beyond. *Nucleic Acids Res.* 35, 604–609 (2007)
- JANSEN, R. C., and NAP, J. P.: Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends in Genetics* 17, 388–391 (2001)
- KÜHN, C., THALLER, G., WINTER, A., BININDA-EMONDS, O. R., KAUPPE, B., ERHARDT, G., BENNEWITZ, J., SCHWERIN, M., and FRIES, R.: Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics* 167, 1873–1881 (2004)
- LIANG, P., and PARDEE, A. B.: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967–971 (1992)
- LIU, H. C., CHENG, H. H., TIRUNAGARU, V., SOFER, L., and BURNSIDE, J.: A strategy to identify positional candidate genes conferring Marek's disease resistance by integrating DNA microarrays and genetic mapping. *Animal Genetics* 32, 351–359 (2001)
- MCKUSICK, V. A., and RUDDLE, F. H.: A new discipline, a new name, a new journal. *Genomics* 1, 1–2 (1987)
- MILAN, D., JEON, J. T., LOOFT, C., AMARGER, V., ROBIC, A., THELANDER, M., ROGEL-GAILLARD, C., PAUL, S., IANNUCELLI, N., RASK, L., RONNE, H., LUNDSTRÖM, K., REINSCH, N., GELLIN, J., KALM, E., ROY, P. L., CHARDON, P., and ANDERSSON, L.: A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 288, 1248–1251 (2000)
- PONSUKSILI, S., JONAS, E., MURANI, E., PHATSARA, C., SRIKANCHAI, T., WALZ, C., SCHWERIN, M., SCHELLANDER, K., and WIMMERS, K.: Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. *BMC Genomics* 9, 367 (2008a)
- PONSUKSILI, S., MURANI, E., PHATSARA, C., JONAS, E., WALZ, C., SCHWERIN, M., SCHELLANDER, K., and WIMMERS, K.: Expression profiling of muscle reveals transcripts differentially expressed in muscle that affect water-holding capacity of pork. *J. Agricult. Food Chem.* 56, 10311–10317 (2008b)
- PONSUKSILI, S., MURANI, E., PHATSARA, C., SCHWERIN, M., SCHELLANDER, K., and WIMMERS, K.: Porcine muscle sensory attributes associate with major changes in gene networks involving CAPZB, ANKRD1, and CTBP2. *Functional and Integrative Genomics* 9, 455–471 (2009)
- PONSUKSILI, S., MURANI, E., PHATSARA, C., SCHWERIN, M., SCHELLANDER, K., and WIMMERS, K.: Expression quantitative trait loci analysis of genes in porcine muscle by quantitative real-time RT-PCR compared to microarray data. *Heredity* DOI:10.1038/hdy.2010.5 (2010)
- PONSUKSILI, S., MURANI, E., WALZ, C., SCHWERIN, M., and WIMMERS, K.: Pre- and postnatal hepatic gene expression profiles of two pig breeds differing in body composition: insight into pathways of metabolic regulation. *Physiol. Genomics* 29, 267–279 (2007)
- PONSUKSILI, S., WIMMERS, K., YERLE, M., and SCHELLANDER, K.: Mapping of 93 porcine ESTs preferentially expressed in liver. *Mammalian Genome* 12, 869–872 (2001)
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W., and BROWN, P. O.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 368–371 (1995)
- SRIKANCHAI, T., MURANI, E., WIMMERS, K., and PONSUKSILI, S.: Four loci differentially expressed in muscle tissue depending on water-holding capacity are associated with meat quality in commercial pig herds. *Mol. Biol. Reports* 37, 595–601 (2010)
- SRIKANCHAI, T., MURANI, E., PHATSARA, C., SCHWERIN, M., SCHELLANDER, K., PONSUKSILI, S., and WIMMERS, K.: Association of ZYX polymorphisms with carcass and meat quality traits in commercial pigs. *Meat Science* 84, 159–164 (2010)

- TE PAS, M. F., DE WIT, A. A., PRIEM, J., CAGNAZZO, M., DAVOLI, R., RUSSO, V., and POOL, M. H.: Transcriptome expression profiles in prenatal pigs in relation to myogenesis. *J. Muscle Res. Cell Motility* 26, 157–165 (2005)
- 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)
- VELCULESCU, V. E., ZHANG, L., VOGELSTEIN, B., and KINZLER, K. W.: Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484–487 (1995)
- WIMMERS, K., MURANI, E., and PONSUKSILI, S.: Expression QTL and their applications in genetic improvement in farm animals. *CAB Reviews* DOI: 10.1079/PAVSNNR20105012 (2010a)
- WIMMERS, K., MURANI, E., and PONSUKSILI, S.: Functional genomics and genetical genomics approaches towards elucidating networks of genes affecting meat performance in pigs. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 9, 251–258 (2010b)
- WIMMERS, K., MURANI, E., and PONSUKSILI, S.: Pre- and postnatal differential gene expression with relevance for meat and carcass traits in pigs. *Animal Science Papers and Reports* 28, 115–122 (2010c)

Prof. Dr. Klaus WIMMERS
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)
Wilhelm-Stahl-Allee 2
18196 Dummerstorf
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 3820868 700
Fax: +49 3820868 702
E-Mail: wimmers@fbn-dummerstorf.de

Computermodelle in der Wissenschaft – zwischen Analyse, Vorhersage und Suggestion

Vorträge anlässlich der Jahresversammlung vom 2. bis 4. Oktober 2009
zu Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 110, Nr. 377

Herausgegeben von Thomas LENGAUER (Saarbrücken)

(2011, 352 Seiten, 152 Abbildungen, 4 Tabellen, DVD, 34,95 Euro,

ISBN: 978-3-8047-2802-8)

Nicht nur die Technik- und Naturwissenschaften, sondern auch die Lebens-, die Sozial- und Kognitionswissenschaften, sogar Kunst und Archäologie sind immer stärker durch eine Informatisierung gekennzeichnet, die einige Disziplinen sogar revolutioniert. Standen früher Wissenschaften auf den fundamentalen Säulen Theoriebildung und Experiment, so hat sich in den letzten Jahrzehnten eine dritte gleichberechtigte Komponente herausgebildet – die der digitalen Modellierung, Simulation und Visualisierung von Strukturen und Prozessen. Der Band behandelt mathematische Grundlagen der Computertechnik, Möglichkeiten und Grenzen der Computermodellierung in den Lebenswissenschaften (Biochemie, Proteomanalyse, Systembiologie) und der Medizin (Tumorchirurgie, Hirnforschung, Rehabilitation), Computer als Dialogpartner (Spracherkennung, Schnittstelle zwischen Gehirn und Maschine), Klimamodelle, Computermodellierungen in Physik und Chemie, aber auch Probleme aus Philosophie (Simulation und Erkenntnis, Implikationen der Hirnforschung) und Ökonomie (Konsequenzen der Alterung der Gesellschaft). Die Beiträge bieten sowohl Laien als auch Experten überraschende Einblicke in eine faszinierende Forschungswelt.

Genomewide Analysis of Epigenetic Mechanisms

Susanne E. ULBRICH (Freising)

Abstract

The ability of the genome to drive and control a single fertilized germ cell to develop to a differentiated multicellular organism is an impressive and complex challenge for the internal control center. During cell differentiation, specific networks of genes are qualitatively, quantitatively, temporarily and spatially differentially expressed to generate a specific phenotype. This differential expression is epigenetically driven by structural alterations of the DNA as well as chromatin modifications, leading to gene activation or gene silencing. The underlying mechanism, the epigenome, may be called a bridge between genotype and phenotype.

One specificity of the epigenome is its flexibility, which allows reacting towards internal and external stimuli without introducing changes to the DNA itself. In addition, epigenetic mechanisms of gene regulation play an important role in physiological adaptation. A most precise analytical description of the epigenome is thus a prerequisite for the understanding of regulatory processes underlying phenotypic variation as well as the implementation of the genetic code.

Next to chromatin regulatory elements, histone modifications and RNA interference, DNA methylation of cytosine bases is one of the most important epigenetic modifications. De- and remethylation are specifically prone to exogenous influences and are discussed as key elements of the etiology of diseases as connection of genetics, environment and disease.

Over the last years there has been enormous improvement in the analysis of genomewide methylation modifications. At first, methylation at specific CpG dinucleotides of single loci was the focus of interest. During the course of rapidly developing global sequencing technology, it became analytically possible to analyse the methylation status on a genomewide level. Quantitative assessment based on a single-basepair resolution became possible, the deciphering of the methylome.

Different technical approaches to analyse DNA methylation patterns and analytical methods to detect regulatory RNA and complex histone modifications have been adopted to the different level of complexity with respect to sensitivity, specificity, quantification, high throughput screening and costs for different scientific questions.

In the “post-genomic era” the deciphering of the epigenome is one of the major tasks to be undertaken, which will have major impact enabling new research approaches in physiological and pathological research.

Zusammenfassung

Die Fähigkeit des Genoms, ausgehend von einer einzigen potenten fertilisierten Keimzelle einen multizellulären differenzierten Organismus zu steuern, stellt eine komplexe Herausforderung an die internen Regelzentren dar. Während der Zelldifferenzierung werden spezifische Netzwerke an Genen qualitativ, quantitativ, zeitlich und räumlich differenziell exprimiert, um einen spezifischen Phänotyp zu generieren. Die differenzielle Expression wird dabei auf epigenetischer Ebene durch Strukturveränderungen der DNA bzw. Chromatinmodifikationen gesteuert, die zur Genaktivierung oder zum Gensilencing führen können. Die der Steuerung zugrundeliegende Mechanismen, das Epigenom, kann als Brücke zwischen Genotyp und Phänotyp verstanden werden.

Eine Besonderheit des Epigenoms ist seine Flexibilität, die es erlaubt, ohne zugrundeliegende DNA-Modifikation auf interne und äußere Umwelteinflüsse zu reagieren. Neben Histonmodifikationen, RNA-Interferenz und Chromatin-Regulationselementen stellt die DNA-Methylierung an Cytosinbasen eine der wichtigsten epigenetischen Modifikationen dar. De- und Remethylierungen werden besonders durch exogene Einflüsse gesteuert und spielen in der Ätiologie

humaner Erkrankungen als Verbindung zwischen Genetik, Erkrankung und Umwelt eine große Rolle. Epigenetische Mechanismen der Genregulation haben aber auch im Rahmen der physiologischen Anpassung eine besondere Bedeutung. Die möglichst präzise analytische Erfassung des Epigenoms ist daher Grundlage für das der phänotypischen Varianz zugrundeliegende Verständnis von Regulationsprozessen sowie der Implementierung des genetischen Kodes.

In den letzten Jahren wurden bemerkenswerte Fortschritte darin erzielt, die Gesamtheit der epigenetischen Modifikationen zu erfassen. Während zunächst die Analyse von genomweitem Methylierungsgrad und spezifischer Methylierung an spezifischen CpG-Dinukleotiden und einzelnen Loci im Mittelpunkt von Methylierungsanalysen stand, hat sich im Zuge der rasant entwickelnden Möglichkeit von globalen Genom-weiten Sequenzierungen die Konstellation ergeben, dass gleichfalls quantitative holistische Methylierungsanalysen, basierend auf der Information der Vielzahl einzelner Basen, durchgeführt werden können – die Entschlüsselung des Methyloms. Verschiedene technische Methoden zur Erfassung von DNA-Methylierungsmustern und analytische Ansätze zur Erfassung der Gesamtheit von regulatorischen RNAs und komplexen Histonmodifikationen sind wegen ihrer Vor- und Nachteile bezüglich der Sensitivität, Spezifität, Quantifizierung, des Probendurchsatzes und der Kosten für spezifische Fragestellungen unterschiedlich gut geeignet.

Wegen der besonders grundlegenden Bedeutung der epigenetischen Regulationsmechanismen ist in der „post-genomischen Epoche“ die Entschlüsselung des Epigenoms eine zentrale Herausforderung, durch deren Kenntnis neue Forschungsansätze in der physiologischen und pathologischen Grundlagenforschung ermöglicht werden.

1. Introduction – Defining “Epigenetics”

Over the last century there have been different definitions of “epigenetics“. By etymological definition, the term epigenetics (greek *επί* – over, above) comprises everything outside conventional genetics. However, epigenetics is closely related to epigenesis, which is the interpretation of the genotype during development to give rise to the phenotype, and thus is as well within a broader context of epigenetic programming. In fact, currently there is a diverse use of the terms “epigenetics”.

In 1942, Conrad WADDINGTON introduced a definition of epigenetics as a process of cellular decision-making during development, causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being (WADDINGTON 1942). This concept of an “epigenetic landscape” was later modified, as an epigenetic trait is considered as a stably heritable phenotype resulting from changes in a chromosome without alterations in the DNA sequence (WADDINGTON 1957).

The definition of “the study of mitotically or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in DNA sequence”, has also been proposed (RUSSO et al. 1996), and only recently JAENISCH and colleagues (JAENISCH and BIRD 2003) stated that the term “epigenetic” refers to “the stable alteration in gene expression potential that arises during development and cell proliferation”.

An operational definition of epigenetics with multiple mechanistic steps that lead to a stably heritable epigenetic state or phenotype may allow to further integrate molecular pathways or mechanistical concepts yet to be discovered (BERGER et al. 2009). By this definition, the epigenators, such as hormones, the extra-cellular matrix and components thereof, nutrition, or inflammation are the transient signs that trigger any kind of molecular response. For this to happen, an appropriate mechanism of intracellular signal uptake, e.g. a receptor, must be present. Secondly, epigenetic initiators like transcription factors, ncRNA or DNA-binding proteins like trithorax and polycomb complexes initiate the establishment of a local chromatin context at a precise location due to sequence recognition. The epigenetic initiator needs to persist in the intracellular compartment, e.g. the nucleus, until the final DNA modifiers or histone variants serving as epigenetic maintainers provide for a stable chromatin state to be maintained over time, e.g. over cell cycles or until a cell is terminally differentiated (BERGER et al. 2009). This broad definition is still not ideal as there are some post-translational histone

modifications with important functions, e.g. in general transcriptional induction and DNA repair. These are typically not considered as being of epigenetic nature (BERGER et al. 2009).

The evolutionary drive to introduce heritable and reversible epigenetic mechanisms of gene regulation in eukaryotic organisms might have been the benefit of a more flexible response to a changing environment through a precise (up to single-base pair site-specificity), fine-tuned (allele-specific expression in case of imprinted loci) and stable (partly due to redundancies) control of gene regulation. Amongst the many epigenetic modifications currently under increased scrutiny, the chromatin modification and remodeling mechanisms, RNAi and DNA modifications will be discussed briefly.

2. Same Genome – Different Epigenome: Examples of Epigenetics

Several examples might illustrate the impact of the epigenome on the phenotype. The honey bee queen does not differ due to genetic background, but only with respect to feeding during larval development (royal jelly) and length of development. Only recently it was shown that silencing of *Dnmt3* in newly hatched larvae led to a royal jelly-like effect on the larval developmental trajectory, leading to morphological queens who had never been exposed to royal jelly (KUCHARSKI et al. 2008). Although there is no transgenerational effect, a mitotic event in a sensitive phase of development is underlying this outstanding phenomenon.

Leptin plays a neurotrophic role during the development of the hypothalamus restricted to a critical neonatal period that precedes leptin's acute regulation of food intake in adults (BOURET et al. 2004). Projections from the arcuate nucleus of the hypothalamus ARH to the paraventricular nucleus PVH are rescued by leptin treatment of neonatal, but not adult, *Lep^{ob}/Lep^{ob}* mice, thus emphasizing that there is a critical window of susceptibility leading to a non-reversible phenotype.

Epidemiological assessment of epigenetic programming has revealed that an unfavorable intrauterine supply influences the metabolic and endocrine constellation of the fetus with permanent programming of the fetal metabolism as indicated by reduced birth weight. This constellation, known as the thrifty-phenotype, which favors survival under detrimental nutritional conditions after birth, may become critical if an unsuspected oversupply of nutrition during critical windows of postnatal development prevails. Then, an impaired glucose-insulin metabolism has been shown to occur, with a personal higher risk of being affected by glucose intolerance, type 2 diabetes, metabolic syndrome at a later stage of adult life (HALES and BARKER 2001).

There are some interesting examples for morphological differences resulting from a different epigenome overlaying the same genome, which can provide a well-defined and sensitive phenotypic read-out to study the epigenetic state of the genome. The most commonly referred model of a diet-induced heritable phenotype is the Agouti viable yellow mouse model. Insertion of an intracisternal A particle (IAP) retroviral element into the agouti locus results in constitutive expression of pheomelanine pigment and ectopically expressed yellow fur. As the agouti-protein is an antagonist of melanocortin-receptor4 (*Mcr4r*) blocking the satiation signal, a misregulation of nutritional intake takes place leading to adipositas and subsequently diabetes. This mouse model is also prone to develop tumors with age (MILLAR et al. 1995). The methylation status at the IAP element is responsible for the change in coat color – when IAP is unmethylated, the agouti gene not only expressed in hair follicles as in wild-type mice,

but also ectopically and ubiquitously – causing yellow fur and subsequent abnormalities. In mottled mice, methylation is mosaic causing promoter activity of the IAP in individual cells, indicating that the methylation pattern of this element is established during early development. However, if hypomethylation of the IAP element is restored by a methyl supplemented diet of the mother during embryonic development, the wild-type phenotype is restored (pseudoagouti offspring) (WOLFF et al. 1998). This model shows that an environmental effect is able to produce a life-long stable change in expression of a gene if exposed during a critical window of time (COONEY et al. 2002). There also appears to be a transgenerational effect, as the offspring of the pseudoagouti mouse have a higher percentage of pseudoagouti correlated with a methylated IAP element, and thus the effect is of epigenetic nature (MORGAN et al. 1999). Some non-imprinted epigenetics modifications are not fully erased during oogenesis and influence the epigenome of the offspring generation, perhaps also throughout life.

The exposure to maternal dietary genistein, a phytoestrogen, during gestation shifts coat color of heterozygous viable yellow agouti ($A^{vy/a}$) offspring toward pseudoagouti, decreases ectopic Agouti expression and protects offspring from obesity through the increased methylation of six CpG sites in the IAP element upstream of the transcription start site of the Agouti gene (DOLINOY et al. 2006). This effect has been shown to be transgenerational. Thus, exogenous stimulants like endocrine disruptors may interfere with or at least take part in the same pathways leading to phenotypic alterations.

However, programming events causing epigenetic changes are not restricted to dietary intake or exposure to a certain agent or chemical. Increased pup licking, grooming and nursing by rat mothers has been shown to alter the offspring's epigenome at the glucocorticoid receptor (GR) gene promoter in the hippocampus (WEAVER et al. 2004). This example demonstrates a maternal effect on stress responses in the offspring showing that behavior as well may affect neuronal function.

3. Epigenetic Modifications

3.1 Chromatin Modifications

Higher-order structure of chromosomes and the nucleus is accomplished through chromatin remodeling factors. These organize the accessibility of DNA to transcription factors by altering the nucleosome structure by e.g. nucleosome eviction or nucleosome sliding (SAHA et al. 2006). Trans-effects (class I) may cause histone modifications that indirectly regulate chromatin structure through recruitment of chromatin-associated proteins (CAP). Cis-effects (class II) are changes in physical properties (e.g. electrostatic charge, tail structure) of modified histone tails that alter the internucleosomal contact. Access to the DNA is facilitated by modifications at specific residues on the histone proteins. Several post-translational histone tail modifications such as acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitinylation are known to regulate the accessibility of the chromatin by inducing either eu- or heterochromatin state and thus contribute to controlling gene expression, e.g. histone acetylation neutralizing positive charges of highly basic histone tails may lead to a localized expansion of nucleosomes. Among these modifications, both activating (H3K4me H3K9ac H3K36me H3S10P H3K79me) as well as repressing (H3K9me H3K27me H3K36me H4K20me) configurative states of DNA transcription have been described (COSGROVE and WOLBERGER 2005).

Histone modifications may be studied by chromatin immunoprecipitation (ChIP), where cells are treated with formaldehyde to fix *in vivo* protein-DNA interactions. The specific histone modifications are immunoprecipitated using antibodies against the modified histone. The DNA is then sheared, protein cross-linking reversed, and the specific DNA fragments interacting with the histone modifications are further analyzed by either PCR amplification, hybridization to complementary DNA fragments on a microarray platform (ChIP-on-Chip) or by incorporating ultra-deep sequencing of the resulting fragments (ChIP-Seq). The latter has even been performed by direct sequencing of single DNA molecules using the HeliScope Genetic Analysis platform, allowing the use of limited amounts of sample material without bias-prone library construction (GOREN et al. 2010).

3.2 Non-Coding RNA

As most important tasks in the cell are performed by proteins, setting the research focus on protein-coding DNA sequences seemed reasonable. Since the entire genomes has been sequenced it has become apparent that only a tiny fraction of the human genome encodes proteins, whereas most, if not all of the genome is transcribed into RNA. This revealed non-protein-coding RNAs that control chromatin structure and genome stability (RANA 2007), but also comprises ontogenetic interaction of genes and environment mediated through neurotransmitters, hormones, and cytokines that effect gene expression and phenotype. Small RNA molecules, microRNAs of 18 to 24 nt in length, are highly conserved and expressed in several species in a tissue and developmental stage specific manner. They are crucial for regulation of important processes such as development, cell proliferation, differentiation, cell cycle regulation, metabolism, and apoptosis. MicroRNAs are subjected to epigenetic changes such as histone modifications and DNA methylation (IORIO et al. 2010), but are also involved in regulation of the epigenetic machinery as they have been shown to target DNA methyltransferases, i.e., enzymes that specifically catalyze the transfer of methyl groups to DNA. Thus, miRNA are contributing to the regulatory loop modulating target gene expression.

The September 2010 release of the microRNA database (miRBase) listed 940 *Homo sapiens* miRNA sequences, and 665 for *Bos taurus*, for most of which the function is as yet unknown, as each miRNA has hundreds of different conserved or non-conserved target genes. Apart from finding the specific mechanisms by which miRNAs interfere with mRNA target genes to inhibit translation, studies on miRNA expression are essential to unravel their function. Techniques may include cDNA array hybridization as well as ultra-deep sequencing of small RNA fractions (CREIGHTON et al. 2009). Real time quantitative PCR (RT-qPCR) and microarray hybridization approaches (HOSSAIN et al. 2009) as well as ultra-high throughput sequencing of miRNAs (small RNA-seq) are popular and widely used profiling methods. All of these profiling approaches face significant introduction of bias. Normalization, often an underestimated aspect of data processing, can minimize systematic technical or experimental variation and thus has significant impact on the detection of differentially expressed miRNAs (MEYER et al. 2010).

3.3 DNA Methylation

DNA methylation in vertebrates comprises the addition of a methyl group at cytosine residues in CG-dinucleotide context, mostly found in genomic regions that contain a high frequency of CG sites called CpG islands. Originally established as a mechanism of host defense to

silence foreign sequence elements by allowing the permanent deactivation of parasitic DNA sequences, DNA methylation can provide genomic stability in highly repetitive regions. It is the most stable of all epigenetic modifications.

DNA methylation is accomplished by DNA methyltransferases with *de novo*- or maintenance properties. After DNA replication, the transiently hemimethylated strand is completed by DNA methyltransferase 1, which is specific to hemimethylated, but not unmethylated, CpG sites on the replicated strand. Thus, CG methylation patterns are passed on to the next cell generation.

When CpG islands are located in promoter regions, DNA methylation is usually causing translational repression. But methylation may also occur in gene bodies of actively transcribed genes (HELLMAN and CHESS 2007), and the differential methylation of a single CpG site might as well be of importance.

Developmental changes in DNA methylation occur primarily in the preimplantation embryo and during primordial germ cell development. In addition, there is growing evidence that changes of DNA methylation and associated gene expression occur during a later stage of development, e.g. during postnatal organ development, which points towards an additional role for DNA methylation in tissue specific differentiation (WATERLAND et al. 2009).

Holistic description of methylation patterns in physiological and pathological settings is of great importance to understand the mechanisms by which global and local methylation patterns designate the accessibility of genomic regions prone to transcriptional activity in certain developmental settings. With this knowledge, epigenetic alterations leading to aberrant gene expression patterns might then be used to explain diseases.

There are several methods for the detection of DNA methylation (5 methyl cytosine, 5^mC). Methylation information is erased during PCR amplification or cloning. Current DNA methylation analysis in either locus specific or global analyses often, but not always (in case of capillary electrophoresis) (DE MONTERA et al. 2010), requires methyl-dependent DNA pretreatment either by enzymatic digestion, affinity enrichment or bisulfite conversion, followed by different strategies to localize the 5^mC in the sequence context (LAIRD 2010).

3.3.1 DNA Pretreatment – Enzyme Digestion

For enzyme digestion, the specificity of isoschizomeres for DNA cleavage is used to specifically cleave methylated and unmethylated sites. In case of MspI/HpaII, MspI cleaves both, while HpaII only cleaves unmethylated CCGG (WAALWIJK and FLAVELL 1978). A qualitative assessment can then be made through standard or 2-D-Gel electrophoresis.

Restriction landmark genome scanning (RLGS) has been used as an early technique to upscale this endonuclease based technique to a genome-wide surveillance tool (HATADA et al. 1991). Here, genomic DNA is radioactively labeled at cleavage sites specific for a rare cleaving methylation-sensitive restriction enzyme, size-fractionated in one dimension, further digested with another more frequently occurring enzyme and separated in the second dimension to detect differences in the pattern of restriction fragments. Although gel electrophoretic techniques are labor-intensive (LAIRD 2010) and may be difficult to standardize, RLGS has been used to detect imprinted loci and sites that are highly methylated as in context of cancer.

Restriction fragmentation may be combined with methylated CpG island amplification (MCA) and array hybridization (MCAM). Restriction fragments are adaptor ligated and PCR amplified prior to array hybridization to reveal even subtle DNA methylation changes. With

this approach, up to 2200 CpG island clones have been measured simultaneously (ESTECIO et al. 2007). Only recently a hybridization microarray study with 3800 gene promoters was used to epigenomically profile physiologically early postnatal liver development in the mouse (WATERLAND et al. 2009). An important finding was that promoters undergoing methylation changes tended not to be associated with CpG islands.

The MCAM results were compared to clonal bisulfite sequencing results as well as to gene expression of the respective gene. In many cases, promoter methylation and gene expression correlated inversely as expected, but there was also an example of promoter methylation correlating directly with transcriptional activity in growing mice. Clearly, MCAM generally identifies not single CpG sites, but rather broad genomic regions undergoing methylation changes. In most genes studied, developmental changes in promoter methylation were associated with expression changes, suggesting both that transcriptional inactivity attracts *de novo* methylation, and that transcriptional activity can override DNA methylation and successively induce developmental hypomethylation (WATERLAND et al. 2009).

Endonuclease digestion gives a modest resolution within each locus because of the average distance of the cleavage sites. If this is combined with array quantification, the achieved resolution depends on the array composition, which may be adopted to advancing functional evidence.

The limited genomic coverage may be a concern regarding restriction enzyme-based approaches for methylation profiling. However, since variation in DNA methylation usually occurs regionally (WEBER et al. 2007), MCAM enabled the identification of broad genomic regions of differential DNA methylation (WEBER et al. 2007). Also, even though single-CpG resolution is desirable, the fact that the methylation status of CpG sites within <1,000 bp is significantly correlated (e.g., ~75 % for <100 bp) means that the ~100 bp resolution is suitable for many applications (WATERLAND et al. 2009).

3.3.2 DNA Pretreatment – Affinity Enrichment

Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) involves the use of a specific antibody recognizing 5-methylcytidine (anti-5^mC) of sonication fractionated, single stranded short DNA strands. After binding and enrichment, the specific short strands carrying methylated CpGs are released from the antibody by proteinase digestion in combination with heat and are subsequently subjected to hybridization array (MeDIP-chip), PCR or ultra-deep sequencing analysis (MeDIP-seq). Alternatively, the affinity capture may be done by using the biotin-based binding to the methyl-CpG binding of the human methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2). If bead-coupled, the sheared DNA may remain double-stranded without the need of denaturation and the elution process from the MBD2 protein may only involve restricted washing, which may allow the fractionated sampling of methylated fragments resulting in a higher resolution during subsequent analysis. A lower degree of DNA quality and quantity is required for affinity enrichment than for endonuclease digestion (LAIRD 2010).

MeDIP is especially suited for genomic regions of high CpG density (WEBER et al. 2007), and it provides a better genome coverage than restriction-enzyme based approaches.

A combination of MeDIP-chip along with MeDIP-seq of the same mature human spermatozoa DNA sample was shown to provide absolute DNA methylation levels across a range of CpG densities (including CpG-poor regions) and gave strong correlations with bisulfite-PCR sequencing controls, allowing DNA methylation measurements at individual CpG sites (DOWN et al. 2008).

3.3.3 DNA Pretreatment – Bisulphite Conversion

The treatment of denatured genomic DNA with sodium bisulphite chemically deaminates unmethylated cytosine (C) residues to uracil (U) much more rapidly than methylated cytosines. The resulting bisulphite treated stable DNA may be analyzed by either PCR amplification, CpG array hybridization or direct sequencing with respect to the unchanged CG (methylated site) or converted CG (unmethylated site), providing that the genomic reference sequence is known.

The gold standard for methylation analysis on a single nucleotide resolution is pyrosequencing. Pyrosequencing is a real-time, step-by-step sequencing procedure that allows quantification of the amount of a certain nucleotide at a certain site. The underlying principle is that a polymerase bound to a template-strand specifically incorporates the complementary nucleotide. After incorporation, pyrophosphate is generated, turned into ATP (sulfurylase) and subsequently into a quantifiable light impulse (luciferase). Excess nucleotides are then degraded by apyrase, after which the next nucleotide in sequence context is injected into the reaction chamber. DNA amplification of bisulphate converted DNA by PCR, an obligatory step to obtain sufficient amounts of DNA for pyrosequencing, is difficult to perform because the DNA strand merely consists of only three nucleotides instead of four, giving a much lesser complexity together with a higher sequence redundancy.

Initially, the genomewide analysis of bisulphite converted DNA was performed using a synchronous analysis of locus-specific assays which required the amplification of known regions before oligonucleotide array hybridization. The GoldenGate BeadArray by Illumina adopted a high-throughput single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping system to DNA methylation detection, based on genotyping the C/T polymorphism of bisulfite-converted genomic DNA. Multiplexed methylationspecific primer extension of bisulphite-converted DNA of more than 1,500 different CpG sites was performed using methylated and unmethylated specific primers at each methylated site under investigation (BIBIKOVA et al. 2006). This method is especially compatible to use with formalin-fixed paraffin-embedded tissue, which is partly degraded, because the bisulphite treatment causes substantial DNA degradation. In general, the demands for high quality DNA with respect to purity and integrity are lower as compared to enzyme treatment, and DNA purification is always needed to remove the sodium bisulphite after conversion (LAIRD 2010). The bisulfite conversion protocol is indeed a bottleneck for a robust methylation profiling assay because incomplete conversion of cytosine to uracil can result in appearance of false-positive methylation signals, and can reduce the overall quality of the assay data. To date, reliable commercial kits are available and suitable internal controls can monitor conversion efficiency.

For reduced representation bisulphite sequencing (RRBS), genomic DNA is digested with a restriction enzyme, size selected, end-repaired and fitted with methylated NGS (Illumina/Solexa) adapters prior to bisulfite treatment and PCR enrichment. Sequenced reads are aligned to a reference genome to infer methylation levels. About 1.0 million distinct CpG dinucleotides were analyzed, from which about half were located in a CpG island context (MEISSNER et al. 2008). Interestingly, it was found that DNA methylation patterns better correlated with histone methylation patterns than with the underlying genome sequence context, and that specifically regulatory regions outside of core promoters were prone to methylation changes during cellular differentiation (MEISSNER et al. 2008).

DNA methylation profiling of human chromosomes 22 by bisulfite DNA treatment followed by DNA sequencing allowed the analysis of high-resolution methylation profiles of ~1.9 million CpG methylation values derived from 12 different tissues (ECKHARDT et al. 2006).

For global methylation analysis, enzyme digestion may be combined with pyrosequencing in a Luminometric Methylation Assay (LUMA) (KARIMI et al. 2006). In case of globally unmethylated DNA, both MspI and HpaII are able to cleave the restriction sites equally, resulting in a ratio of 1, whereas in a methylated state, HpaII will cleave fewer sites. LUMA cannot measure total cytosine methylation within the genome, as is achieved by HPLC or mass spectroscopy. About 50 % of the HpaII/MspI recognition sequence 5'-CCGG-3' are located in repetitive and 50 % in unique DNA sequences, and even though these are accumulated at CpG islands, CpG islands only comprise about 1 % of the genome (FAZZARI and GREALLY 2004). Therefore, methylation effects measured by LUMA are dominated by methylation outside of CpG islands within simple repeat sequences such as DNA satellites and transposons. These are thought to play a critical role in genomic defense and structural integrity by silencing the expression of transposable elements that may cause chromosomal rearrangements and translocations (WILSON et al. 2007). Thus, LUMA provides an alternative approach to HPLC or mass spectroscopy for the estimation of global DNA methylation.

3.3.4 Which Technique to Use? Considering Different DNA Methylation Approaches

The number of samples to be analyzed, the quality and quantity of DNA as well as the desired coverage and resolution of the genome will determine the technique to be used for DNA methylation analysis. The number of sample throughput may be increased with highly automated techniques, but investment and reagent costs are concomitantly intensive. To date, enzyme-based and affinity-enrichment methods are labor intensive and thus exclude the possibility of large up-scaling (LAIRD 2010).

Accuracy and reproducibility, allele specificity, polymorphisms and copy-number variation as well as sensitivity are additional features which must be considered by interpreting results from different techniques used (LAIRD 2010).

As a principle, two genomic alleles in each cell can either be both methylated, both unmethylated, or there may be monoallelic methylation as in many imprinted genes. It is important to consider that as samples normally derive from a collection of cells, a tissue may have an average methylation level at a single genomic locus across many DNA molecules. Clonal bisulfite sequencing results can provide a discrete resolution of methylation patterns corresponding to single DNA molecules of single cells. Many other analyses, e.g. pyrosequencing, comprise of a large number of target sequences along individual DNA molecules providing an average percentage of methylation at each locus or CpG site.

Potential source of bias affect accuracy and reproducibility, e.g. in terms of copy-number variation for MeDIP approaches (LAIRD 2010). There is a fragment-size bias if enzyme-based methods are used. Hybridization efficiency or library construction efficiency for deep sequencing may cause a bias as well. Incomplete bisulphite conversion might cause bisulphite PCR bias as well as incomplete denaturation or reannealing, or differential PCR efficiency for methylated and unmethylated sequence contexts. A bias due to cross-hybridization may be a problem in any array context, as well as GC content and CpG density bias in ultra-deep sequencing approaches.

Depending on the organism to be studied, there might not be commercially available hybridization arrays, and as mentioned above, for ultra-deep sequencing there is the need for a reference sequence of the species to be studied.

4. Future Challenges

In the year 2000, a human genome working draft with a $10 \times$ coverage took about 10 years to complete at a cost of \$ 3,000,000,000. Eight years later, the major genome centers were able to sequence the same number of nucleotides every 4 days, which was achieved in around 4 hours in 2009 (\$ 25,000). In 2010, a $10 \times$ human genome coverage is achieved every 14 minutes for approximately \$5,000. The bioinformatics revolution lags far behind, so that today's challenges are to cope with the data surge. Statistical issues in DNA methylation analysis are currently being addressed (reviewed in LAIRD 2010). There are advancements, e.g. the MeDIP-seq data of DOWN et al. (2008) mentioned earlier were integrated into the rapidly growing database of the National Institutes of Health, US, Roadmap Epigenomic Project Initiative (<http://www.roadmapepigenomics.org/>). It is of great excitement to think of an integrated high-resolution DNA methylation profile, a methylome (BECK and RAKYAN 2008), linking the level of epigenetics with the currently available -omics (e.g. genome, transcriptome, proteome, metabolome, secretome). Other than the genome, certainly the mammalian methylome is most likely specific for species, organ, cell type, developmental stage, and labile to environmental cues. By elucidating the potential epigenetic basis for developmental programming and phenotypic variation, a dynamic understanding of the role of epigenetics will be on hand.

As technical development proceeds, the introduction of 3rd Generation Sequencing technology like the nanopore sequencing (BRANTON et al. 2008) is likely to once more drive the possibilities for gathering genomic information on the dynamic epigenome on a single-base-pair resolution. Nanopore sequencing utilizes the nanopore-based device providing single-molecule detection by electrophoretically driving molecules in solution through a nano-scale pore which is then most probably able to reliably distinguish methylated from non-methylated cytosine molecules directly.

5. Conclusion

An endogenous or exogenous impact that may be small at a critical point in time may lead to an unexpected outcome. However, there are critical and less critical windows to challenges, and not all tissues or cell types are involved in the same way. The interaction of environmental signals and gene expression may be realized at the level of the epigenome.

The epigenome comprises the individual adaptation to environmental challenges resulting in gene expression patterns that are heritable and may emerge as transgenerational effect. A flexible, dynamic epigenome opens a window for short-term modulatory actions due to a change of settings.

A single gene (as well as a casual mutation) can cause a distinct phenotype. However, there are numerous examples for a number of genes that may as well underlie a complex phenotype, and a single gene may be involved in different phenotypic expression. Therefore,

assembling the levels of genome, transcriptome, proteome and metabolome may enable the explanation of phenotypic variation. Implementing the epigenome (comprising methylome as well as chromatin state) as an additional regulatory level can add substantial merit to explaining the phenotype.

To date, there is a lack of knowledge on how genes, genomes and chromatin are regulated during normal development, health and disease. Current and future genome-wide methods to study epigenetic modifications, epigenomics, may help to unravel the complexity of gene regulation. Using extensive bioinformatical approaches, future read-outs may unravel further functional interactions between the different regulatory levels on a gene- and genome-wide scale.

With the availability of the genome sequence of taurine cattle (ELSIK et al. 2009), a basis has been established for an increased understanding of genetic variation of livestock. Transcriptomics as well as proteomic and metabolomic approaches are well under way into animal sciences, e.g. own studies specifically focusing on the physiology of early bovine preimplantation events attempting to understand early embryonic losses (BAUERSACHS et al. 2008, 2009, BERENDT et al. 2005, 2009, GROEBNER et al. 2011, ULBRICH et al. 2009).

Unraveling the epigenome may not only increase the knowledge on potentially important molecules involved, but may also significantly impact the assessment of environmental factors as key events constituting performance. In animal sciences, an integration of this concept into current breeding strategies may include the selection of a suitable epigenotype in addition to the genotype.

Acknowledgement

I acknowledge the contribution of S. HIENDLER critically commenting the manuscript.

References

- BAUERSACHS, S., MITKO, K., ULBRICH, S. E., BLUM, H., and WOLF, E.: Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 116, 371–384 (2008)
- BAUERSACHS, S., ULBRICH, S. E., ZAKHARTCHENKO, V., MINTEN, M., REICHENBACH, M., REICHENBACH, H. D., BLUM, H., SPENCER, T. E., and WOLF, E.: The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5681–5686 (2009)
- BECK, S., and RAKYAN, V. K.: The methylome: approaches for global DNA methylation profiling. *Trends Genet.* 24, 231–237 (2008)
- BERENDT, F. J., FROHLICH, T., BOLBRINKER, P., BOELHAUVE, M., GUNGOR, T., HABERMANN, F. A., WOLF, E., and ARNOLD, G. J.: Highly sensitive saturation labeling reveals changes in abundance of cell cycle-associated proteins and redox enzyme variants during oocyte maturation in vitro. *Proteomics* 9, 550–564 (2009)
- BERENDT, F. J., FROHLICH, T., SCHMIDT, S. E., REICHENBACH, H. D., WOLF, E., and ARNOLD, G. J.: Holistic differential analysis of embryo-induced alterations in the proteome of bovine endometrium in the preattachment period. *Proteomics* 5, 2551–2560 (2005)
- BERGER, S. L., KOUZARIDES, T., SHIEKHATTAR, R., and SHILATIFARD, A.: An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 23, 781–783 (2009)
- BIBIKOVA, M., LIN, Z., ZHOU, L., CHUDIN, E., GARCIA, E. W., WU, B., DOUCET, D., THOMAS, N. J., WANG, Y., VOLLMER, E., GOLDMANN, T., SEIFART, C., JIANG, W., BARKER, D. L., CHEE, M. S., FLOROS, J., and FAN, J. B.: High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genom. Res.* 16/3, 383–393 (2006)
- BOURET, S. G., DRAPER, S. J., and SIMERLY, R. B.: Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304/5667, 108–110 (2004)
- BRANTON, D., DEAMER, D. W., MARZIALI, A., BAYLEY, H., BENNER, S. A., BUTLER, T., DI, V. M., GARAJ, S., HIBBS, A., HUANG, X., JOVANOVIH, S. B., KRSTIC, P. S., LINDSAY, S., LING, X. S., MASTRANGELO, C. H., MELLER, A.,

- OLIVER, J. S., PERSHIN, Y. V., RAMSEY, J. M., RIEHN, R., SONI, G. V., TABARD-COSSA, V., WANUNU, M., WIGGIN, M., and SCHLOSS, J. A.: The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnol.* 26, 1146–1153 (2008)
- COONEY, C. A., DAVE, A. A., and WOLFF, G. L.: Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J. Nutr.* 132, 2393S–2400S (2002)
- COSGROVE, M. S., and WOLBERGER, C.: How does the histone code work? *Biochem. Cell Biol.* 83, 468–476 (2005)
- CREIGHTON, C. J., REID, J. G., and GUNARATNE, P. H.: Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief. Bioinform.* 10, 490–497 (2009)
- DOLINOV, D. C., WEIDMAN, J. R., WATERLAND, R. A., and JIRTLE, R. L.: Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ. Health Perspect.* 114, 567–572 (2006)
- DOWN, T. A., RAKYAN, V. K., TURNER, D. J., FLICEK, P., LI, H., KULESHA, E., GRAF, S., JOHNSON, N., HERRERO, J., TOMAZOU, E. M., THORNE, N. P., BACKDAHL, L., HERBERTH, M., HOWE, K. L., JACKSON, D. K., MIRETTI, M. M., MARIONI, J. C., BIRNEY, E., HUBBARD, T. J., DURBIN, R., TAVARE, S., and BECK, S.: A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. *Nature Biotechnol.* 26, 779–785 (2008)
- ECKHARDT, F., LEWIN, J., CORTESE, R., RAKYAN, V. K., ATTWOOD, J., BURGER, M., BURTON, J., COX, T. V., DAVIES, R., DOWN, T. A., HAEFLIGER, C., HORTON, R., HOWE, K., JACKSON, D. K., KUNDE, J., KOENIG, C., LIDDLE, J., NIBLETT, D., OTTO, T., PETTETT, R., SEEMANN, S., THOMPSON, C., WEST, T., ROGERS, J., OLEK, A., BERLIN, K., and BECK, S.: DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nature Genet.* 38, 1378–1385 (2006)
- ELSIK, C. G., TELLAM, R. L., WORLEY, K. C., GIBBS, R. A., MUZY, D. M., WEINSTOCK, G. M., ADELSON, D. L., EICHLER, E. E., ELNITSKI, L., GUIGO, R., HAMERNIK, D. L., KAPPES, S. M., LEWIN, H. A., LYNN, D. J., NICHOLAS, F. W., REYMOND, A., RIJNKELS, M., SKOW, L. C., ZDOBNOV, E. M., SCHOOK, L., WOMACK, J., ALIOTO, T., ANTONARAKIS, S. E., ASTASHYN, A., CHAPPLE, C. E., CHEN, H. C., CHRAST, J., CAMARA, F., ERMOLAEVA, O., HENRICHSEN, C. N., HLAVINA, W., KAPUSTIN, Y., KIRYUTIN, B., KITTS, P., KOKOCINSKI, F., LANDRUM, M., MAGLOTT, D., PRUITT, K., SAPOJNIKOV, V., SEARLE, S. M., SOLOVYEV, V., SOUVOROV, A., UCLA, C., WYSS, C., ANZOLA, J. M., GERLACH, D., ELHAIK, E., GRAUR, D., REESE, J. T., EDGAR, R. C., MCEWAN, J. C., PAYNE, G. M., RAISON, J. M., JUNIER, T., KRIVENTSEVA, E. V., EYRAS, E., PLASS, M., DONTU, R., LARKIN, D. M., REECY, J., YANG, M. Q., CHEN, L., CHENG, Z., CHITKO-MCKOWN, C. G., LIU, G. E., MATUKUMALLI, L. K., SONG, J., ZHU, B., BRADLEY, D. G., BRINKMAN, F. S., LAU, L. P., WHITESIDE, M. D., WALKER, A., WHEELER, T. T., CASEY, T., GERMAN, J. B., LEMAY, D. G., MAQBOOL, N. J., MOLENAAR, A. J., SEO, S., STOTHARD, P., BALDWIN, C. L., BAXTER, R., BRINKMEYER-LANGFORD, C. L., BROWN, W. C., CHILDERS, C. P., CONNELLEY, T., ELLIS, S. A., FRITZ, K., GLASS, E. J., HERZIG, C. T., IIVANAINEN, A., LAHMERS, K. K., BENNETT, A. K., DICKENS, C. M., GILBERT, J. G., HAGEN, D. E., SALIH, H., AERTS, J., CAETANO, A. R., DALRYMPLE, B., GARCIA, J. F., GILL, C. A., HIENDLEDER, S. G., MEMILI, E., SPURLOCK, D., WILLIAMS, J. L., ALEXANDER, L., BROWNSTEIN, M. J., GUAN, L., HOLT, R. A., JONES, S. J., MARRA, M. A., MOORE, R., MOORE, S. S., ROBERTS, A., TANIGUCHI, M., WATERMAN, R. C., CHACKO, J., CHANDRABOSE, M. M., CREE, A., DAO, M. D., DINH, H. H., GABISI, R. A., HINES, S., HUME, J., JHANGIANI, S. N., JOSHI, V., KOVAR, C. L., LEWIS, L. R., LIU, Y. S., LOPEZ, J., MORGAN, M. B., NGUYEN, N. B., OKWUONU, G. O., RUIZ, S. J., SANTIBANEZ, J., WRIGHT, R. A., BUHAY, C., DING, Y., DUGAN-ROCHA, S., HERDANDEZ, J., HOLDER, M., SABO, A., EGAN, A., GOODELL, J., WILCZEK-BONEY, K., FOWLER, G. R., HITCHENS, M. E., LOZADO, R. J., MOEN, C., STEFFEN, D., WARREN, J. T., ZHANG, J., CHIU, R., SCHEIN, J. E., DURBIN, K. J., HAVLAK, P., JIANG, H., LIU, Y., QIN, X., REN, Y., SHEN, Y., SONG, H., BELL, S. N., DAVIS, C., JOHNSON, A. J., LEE, S., NAZARETH, L. V., PATEL, B. M., PU, L. L., VATTATHIL, S., WILLIAMS, R. L. Jr., CURRY, S., HAMILTON, C., SODERGREN, E., WHEELER, D. A., BARRIS, W., BENNETT, G. L., EGGEN, A., GREEN, R. D., HARHAY, G. P., HOBBS, M., JANN, O., KEELE, J. W., KENT, M. P., LIEN, S., MCKAY, S. D., MCWILLIAM, S., RATNAKUMAR, A., SCHNABEL, R. D., SMITH, T., SNELLING, W. M., SONSTEGARD, T. S., STONE, R. T., SUGIMOTO, Y., TAKASUGA, A., TAYLOR, J. F., VAN TASSELL, C. P., MACNEIL, M. D., ABATEPAULO, A. R., ABBEY, C. A., AHOLA, V., ALMEIDA, I. G., AMADIO, A. F., ANATRIELLO, E., BAHADUE, S. M., BIASE, F. H., BOLDT, C. R., CARROLL, J. A., CARVALHO, W. A., CERVIELATTI, E. P., CHACKO, E., CHAPIN, J. E., CHENG, Y., CHOI, J., COLLEY, A. J., CAMPOS, T. A. de, DE, D. M., SANTOS, I. K., OLIVEIRA, C. J. de, DEOBALD, H., DEVINOY, E., DONOHUE, K. E., DOVC, P., EBERLEIN, A., FITZSIMMONS, C. J., FRANZIN, A. M., GARCIA, G. R., GENINI, S., GLADNEY, C. J., GRANT, J. R., GREASER, M. L., GREEN, J. A., HADSELL, D. L., HAKIMOV, H. A., HALGREN, R., HARROW, J. L., HART, E. A., HASTINGS, N., HERNANDEZ, M., HU, Z. L., INGHAM, A., ISO-TOURU, T., JAMIS, C., JENSEN, K., KAPETIS, D., KERR, T., KHALIL, S. S., KHATIB, H., KOLBEHDARI, D., KUMAR, C. G., KUMAR, D., LEACH, R., and LEE, J. C.: The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324, 522–528 (2009)
- ESTECIO, M. R., YAN, P. S., IBRAHIM, A. E., TELLEZ, C. S., SHEN, L., HUANG, T. H., and ISSA, J. P.: High-throughput methylation profiling by MCA coupled to CpG island microarray. *Genome Res.* 17, 1529–1536 (2007)
- FAZZARI, M. J., and GREALLY, J. M.: Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature Rev. Genet.* 5, 446–455 (2004)

- GOREN, A., OZSOLAK, F., SHORESH, N., KU, M., ADLI, M., HART, C., GYMREK, M., ZUK, O., REGEV, A., MILOS, P. M., and BERNSTEIN, B. E.: Chromatin profiling by directly sequencing small quantities of immunoprecipitated DNA. *Nature Methods* 7, 47–49 (2010)
- GROEBNER, A. E., RUBIO-ALIAGA, I., SCHULKE, K., REICHENBACH, H. D., DANIEL, H., WOLF, E., MEYER, H. H. D., and ULBRICH, S. E.: Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen during preimplantation. *Reproduction* 141/5, 685–695 (2011)
- HALES, C. N., and BARKER, D. J.: The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* 60, 5–20 (2001)
- HATADA, I., HAYASHIZAKI, Y., HIROTSUNE, S., KOMATSUBARA, H., and MUKAI, T.: A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9523–9527 (1991)
- HELLMAN, A., and CHESS, A.: Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 315, 1141–1143 (2007)
- HOSSAIN, M. M., GHANEM, N., HOELKER, M., RINGS, F., PHATSARA, C., THOLEN, E., SCHELLANDER, K., and TESFAYE, D.: Identification and characterization of miRNAs expressed in the bovine ovary. *BMC Genomics* 10, 443 (2009)
- IORIO, M. V., PIOVAN, C., and CROCE, C. M.: Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: An intricate network. *Biochim. Biophys. Acta* 1799/10–12, 694–701 (2010)
- JAENISCH, R., and BIRD, A.: Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genet.* 33, Suppl., 245–254 (2003)
- KARIMI, M., JOHANSSON, S., and EKSTROM, T. J.: Using LUMA: a Luminometric-based assay for global DNA-methylation. *Epigenetics* 1, 45–48 (2006)
- KUCHARSKI, R., MALESZKA, J., FORET, S., and MALESZKA, R.: Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319, 1827–1830 (2008)
- LAIRD, P. W.: Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Rev. Genet.* 11, 191–203 (2010)
- MEISSNER, A., MIKKELSEN, T. S., GU, H., WERNIG, M., HANNA, J., SIVACHENKO, A., ZHANG, X., BERNSTEIN, B. E., NUSBAUM, C., JAFFE, D. B., GNIRKE, A., JAENISCH, R., and LANDER, E. S.: Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454, 766–770 (2008)
- MEYER, S. U., PFAFFL, M. W., and ULBRICH, S. E.: Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a ‘normal’ way to a hidden layer of complexity? *Biotechnol. Lett.* 32/12, 1777–1788 (2010)
- MILLAR, S. E., MILLER, M. W., STEVENS, M. E., and BARSH, G. S.: Expression and transgenic studies of the mouse agouti gene provide insight into the mechanisms by which mammalian coat color patterns are generated. *Development* 121, 3223–3232 (1995)
- MONTERA, B. DE, EL, Z. D., MULLER, S., JAMMES, H., BREM, G., REICHENBACH, H. D., SCHEIPL, F., CHAVATTE-PALMER, P., ZAKHARTCHENKO, V., SCHMITZ, O. J., WOLF, E., RENARD, J. P., and HIENDLEDER, S.: Quantification of leukocyte genomic 5-methylcytosine levels reveals epigenetic plasticity in healthy adult cloned cattle. *Cell Reprogram.* 12, 175–181 (2010)
- 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)
- RANA, T. M.: Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23–36 (2007)
- RUSSO, V., MARTIENSEN, R., and RIGGS, A. (Eds.): *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Woodbury (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press 1996
- SAHA, A., WITTMAYER, J., and CAIRNS, B. R.: Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 437–447 (2006)
- ULBRICH, S. E., SCHULKE, K., GROEBNER, A. E., REICHENBACH, H. D., ANGIONI, C., GEISLINGER, G., and MEYER, H. H.: Quantitative characterization of prostaglandins in the uterus of early pregnant cattle. *Reproduction* 138, 371–382 (2009)
- WAALWIJK, C., and FLAVELL, R. A.: MspI, an isoschizomer of hpaII which cleaves both unmethylated and methylated hpaII sites. *Nucleic Acids Res.* 5, 3231–3236 (1978)
- WADDINGTON, C. H.: Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* 150, 563–566 (1942)
- WADDINGTON, C. H.: *The Strategy of the Genes*. London (UK): Allen & Unwin 1957
- WATERLAND, R. A., KELLERMAYER, R., RACHED, M. T., TATEVIAN, N., GOMES, M. V., ZHANG, J., ZHANG, L., CHAKRAVARTY, A., ZHU, W., LARITSKY, E., ZHANG, W., WANG, X., and SHEN, L.: Epigenomic profiling indicates a role for DNA methylation in early postnatal liver development. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3026–3038 (2009)
- WEAVER, I. C., CERVONI, N., CHAMPAGNE, F. A., D’ALESSIO, A. C., SHARMA, S., SECKL, J. R., DYMOV, S., SZYF, M., and MEANEY, M. J.: Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neurosci.* 7, 847–854 (2004)

- WEBER, M., HELLMANN, I., STADLER, M. B., RAMOS, L., PAABO, S., REBHAN, M., and SCHUBELER, D.: Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genet.* 39, 457–466 (2007)
- WILSON, A. S., POWER, B. E., and MOLLOY, P. L.: DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1775, 138–162 (2007)
- WOLFF, G. L., KODELL, R. L., MOORE, S. R., and COONEY, C. A.: Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J.* 12, 949–957 (1998)

PD Dr. Susanne E. ULBRICH
Technische Universität München
Lehrstuhl für Physiologie
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Technische Universität München
Weihenstephaner Berg 3
85354 Freising
Germany
Phone: + 49 8161 714429
Fax: + 49 8161 714204
E-Mail: ulbrich@wzw.tum.de

Komparative Genomik bei Haustieren als bioinformatischer Ansatz

Tanja KUNEJ, Jernej OGOREVC, Crt GORUP, Eva CEH, Blaz ZUPAN
und Peter DOVČ (Ljubljana, Slowenien)

Mit 11 Abbildungen und 1 Tabelle

Zusammenfassung

Die rasche Entwicklung neuer Methoden zur Genomanalyse hat zu einer Situation geführt, in der uns zwar umfangreiche, meist öffentlich zugängliche Datensätze zur Verfügung stehen, deren Integration, biologisch sinnvolle Vernetzung und Interpretation aber noch immer eine Herausforderung bleiben, die erst in den letzten Jahren mit neuesten bioinformatischen Ansätzen für den praktischen Tierzüchter brauchbare Ergebnisse liefern kann. Deswegen stellen wir in diesem Beitrag eine neue, auf eine grafische Darstellung in Form einer Genkarte gestützte, Strategie vor, die die Integration verschiedener Datentypen ermöglicht.

Abstract

As a consequence of rapid methodological development in the field of genome analysis, we are faced with the situation where huge data sets are available, often in the public domain. However, their integration, establishment of biological networks and comprehensive interpretation still represent a challenge which just recently with the development of novel bioinformatics tools became a feasible task. Data integration and causal interconnection of different pieces of evidence can certainly deliver useful information also for practical animal breeding. Therefore, we here present a new, gene map based, approach for representation and integration of different types of data which allows a new holistic approach to farm animal genome analysis.

1. Einleitung (Problemstellung)

Die verschiedenen Versuchsansätze, die methodologisch von Genomsequenzierung über transkriptomische, proteomische, metabolomische und interaktomische Studien bis zur *Quantitative-Trait-Locus* (QTL)-Kartierung und zu Assoziationsstudien reichen, produzieren in der Regel große Datensätze, die zwar eine Fülle von detaillierten Informationen liefern, deren Integration und komplexe Interpretation aber die Entwicklung von neuen bioinformatischen Ansätzen verlangt. Oft ist eine direkte Verknüpfung von Daten aus verschiedenen Versuchsansätzen nicht möglich und verlangt nach einer gemeinsamen Plattform, die anhand der Integration verschiedener Datentypen neue Schlussfolgerungen erlauben würde. In den letzten Jahren wurden einige bioinformatische Werkzeuge entwickelt, die die kausale Verknüpfung von Genen, Proteinen und regulatorischen RNA-Molekülen ermöglichen.

In diesem Beitrag stellen wir eine Strategie vor, die auf der Integration verschiedener Datentypen, die von unterschiedlichen Tierarten und Tiermodellen stammen, in Form einer integrierten Genkarte beruht. Mit der Strategie versuchen wir, die Vorteile der komparativen Ge-

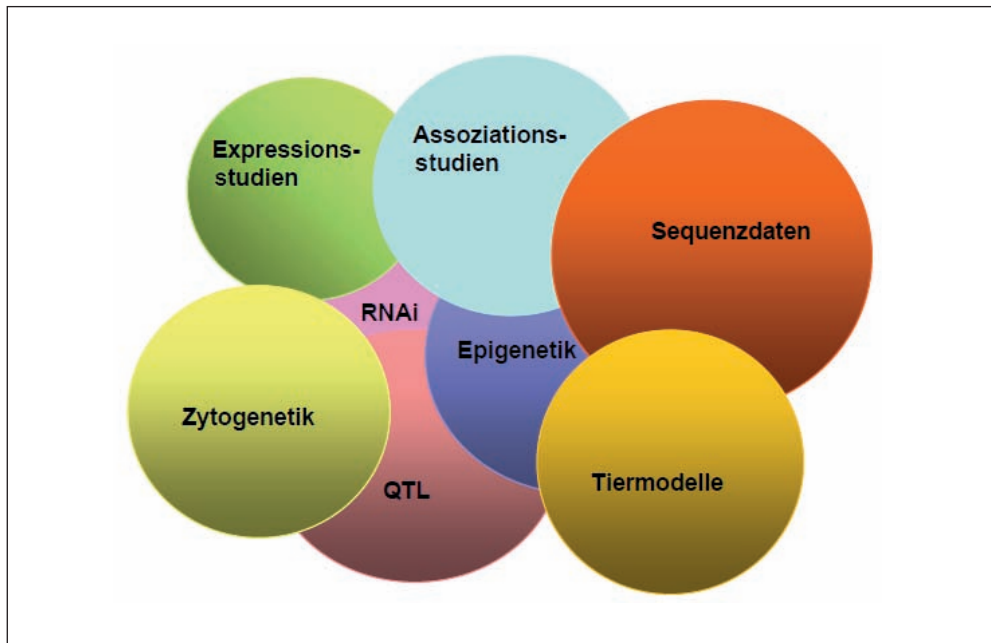


Abb. 1 Umfangreiche Datensätze aus unterschiedlichen Quellen stehen in öffentlichen Datensammlungen zur Verfügung.

nomik mit der Aussagekraft der graphischen Visualisierung zu kombinieren. Die Verwendung von verschiedenen bioinformatischen Ansätzen wird an den Beispielen von mitochondrialem Transkriptionsfaktor TFAM, männlichen Reproduktionsmerkmalen und der Genexpression in der Milchdrüse illustriert.

2. *In-silico*-Klonierung

In den Situationen, wo die Sequenzdaten nicht im benötigten Umfang und nicht für die Tierarten, die im Mittelpunkt unseres Interesses stehen, zur Verfügung stehen, müssen wir Strategien entwickeln, die es uns ermöglichen, die benötigten Daten zu gewinnen und sie zur Lösung der biologischen Fragestellung anzuwenden. *In-silico*-Klonierung ist eine solche Strategie, die uns mit der Kombination von DNA- und cDNA-Sequenzinformation und mit vergleichender Sequenzanalyse bei verschiedenen Arten ermöglicht, die fehlenden Sequenzabschnitte zu rekonstruieren. Die Strategie ist besonders brauchbar in Situationen, wo die gesamte Genomsequenz der untersuchten Tierart nicht vorhanden ist. Trotz einer täglich wachsenden Anzahl sequenzierter tierischer Genome werden wir in der Tierzucht noch einige Zeit mit fehlenden oder nicht lückenlos sequenzierten Genomabschnitten zu tun haben (*The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium* 2009). Eine zusätzliche Komplikation dürften die rassenspezifischen Unterschiede darstellen, die einen direkten Vergleich von homologen Genregionen zusätzlich erschweren. Eine direkte Folge von solchen Unterschieden stellt die Inkonsistenz der informativen Markerloci und QTL zwischen den Rassen dar. Im Folgenden

werden wir die Strategie am Beispiel des Rindergens für den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM-Gen, TFAM – *Mitochondrial Transcription Factor A*) erläutern.

Als wir mit der Analyse der Rinder-TFAM-Region begonnen haben, lagen uns weder eine vollständige cDNA noch eine lückenlose genomische DNA-Sequenz in dem Bereich vor. Zum Glück waren in den öffentlichen Datenbanken Sequenzen von längeren Abschnitten (*Contigs*) des Rindergenoms in der Region vorhanden sowie auch die gesamte Sequenz für die menschliche TFAM-cDNA.

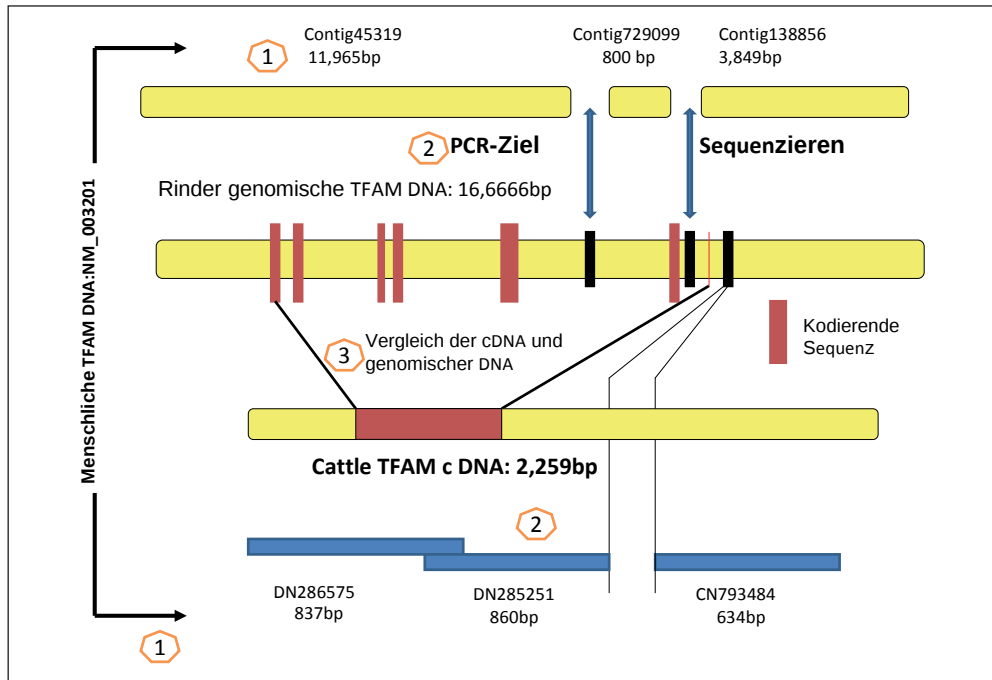


Abb. 2 Strategie für *In-silico*-Klonierung des Rindergens für den mitochondrialen Transkriptionsfaktor TFAM (adaptiert von JIANG et al. 2005).

Die Strategie wurde in drei Schritte unterteilt: (1.) BLAST¹-Suche mit vollständiger cDNA-Sequenz nach genomischen Rindersequenzen, die eine hohe Sequenzhomologie mit der menschlichen cDNA aufwiesen, (2.) Sequenzannotation der EST²-Sequenzen und genomischer Rinderfragmente, um Primer entwerfen zu können, die Schließung der Lücken und die Konstruktion der gesamten Rinder-TFAM-cDNA ermöglichen würden, und (3.) Vergleich der genomischen und cDNA-Sequenzen, um die genomische Organisation der TFAM-kodierenden Region beim Rind voraussagen zu können. Um eine vollständige genomische Sequenz zu erstellen, war es notwendig, zwei Sequenzlücken mit gezielter PCR und nachfolgender Sequenzierung der PCR-Produkte zu schließen. Die detaillierte Strategie ist in der Abbildung 2 dargestellt.

1 BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*.

2 EST – *Expressed Sequence Tag*.

Die weitere Analyse der genomischen Sequenz des Rinder-TFAM-Gens hat später zur Entdeckung des doppelten Polymorphismus in der Promotorregion geführt, der mit der Fettanlagerung und dem Verfettungsgrad assoziiert ist. Dieses Beispiel zeigt, wie man erfolgreich oft fragmentierte cDNA- und genomische DNA-Sequenzen zusammenfügen kann und so verschiedene Informationsquellen zur Lösung des biologischen Problems verwenden kann.

Die Vergleiche der Exon/Intron-Struktur bei verschiedenen Tierarten und die Sequenzierung der TFAM-mRNA aus unterschiedlichen Geweben haben beim Schwein ein alternatives Ausschneiden der Exone festgestellt, das anhand der bei anderen Tierarten bekannten evolutionsmäßig hochkonservierten Exon/Intron-Organisation entdeckt werden konnte (Abb. 3). Allerdings sind die biologische Relevanz verschiedener TFAM-Varianten und die gewebespezifische Verteilung unterschiedlicher Formen noch nicht bekannt. Zwei unterschiedliche mRNA-Formen für TFAM-mRNA beim Schwein unterscheiden sich genau um ein ganzes Exon, das in der kurzen Form zusammen mit den Introns 2 und 3 ausgeschnitten wird, und in einer mRNA, die um 102 bp kürzer als die lange Form ist, was eine Deletion von 34 Aminosäuren zur Folge hat.

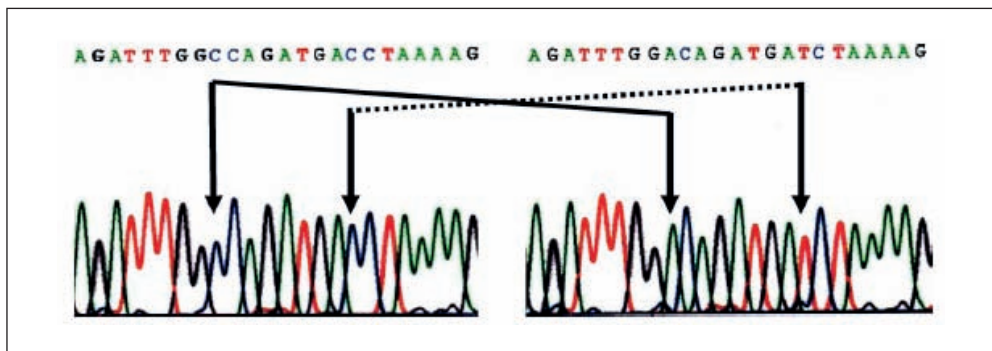


Abb. 3 Zwei eng gekoppelte Polymorphismen (C/A und C/T) im Promotor des Rinder-TFAM-Gens, das mit Fettanlagerung und Verfettungsgrad assoziiert ist. Links ist eine doppelte CC/CC-Homozygote und rechts ein doppelte AA/TT-Homozygote dargestellt (nach JIANG et al. 2005).

Die Vorteile der vergleichenden Genomanalyse liegen u. a. auch bei der Identifizierung der Regulationselemente, die oft zwischen den Tierarten hochkonserviert und von großer Bedeutung sind.

Ein Beispiel für die evolutionsmäßig erhaltene regulatorische Region im Genom verschiedener Wirbeltiere stellt auch die Zielregion für die Mikro-RNA miR-27ab dar, die in der 3'-untranslatierten Region des Genes für TFAM liegt. Die Regulation der TFAM-Expression beruht auf der Bindung der miR-27ab an die hochkonservierte Stelle, die die Verwendung der mRNA als Matrize für die Proteinsynthese verhindert (Abb. 4). Die Identifizierung von solchen Regulationselementen ermöglicht vergleichende Analysen von Mechanismen, die an der komplexen Steuerung der Genexpression beteiligt sind.

3. Integration von verschiedenen Datentypen

Komplexe Eigenschaften, die in der Tierzucht oft im Zentrum des züchterischen Interesses stehen, sind oft Gegenstand unterschiedlichster Analyseverfahren. Auch die Informationen,

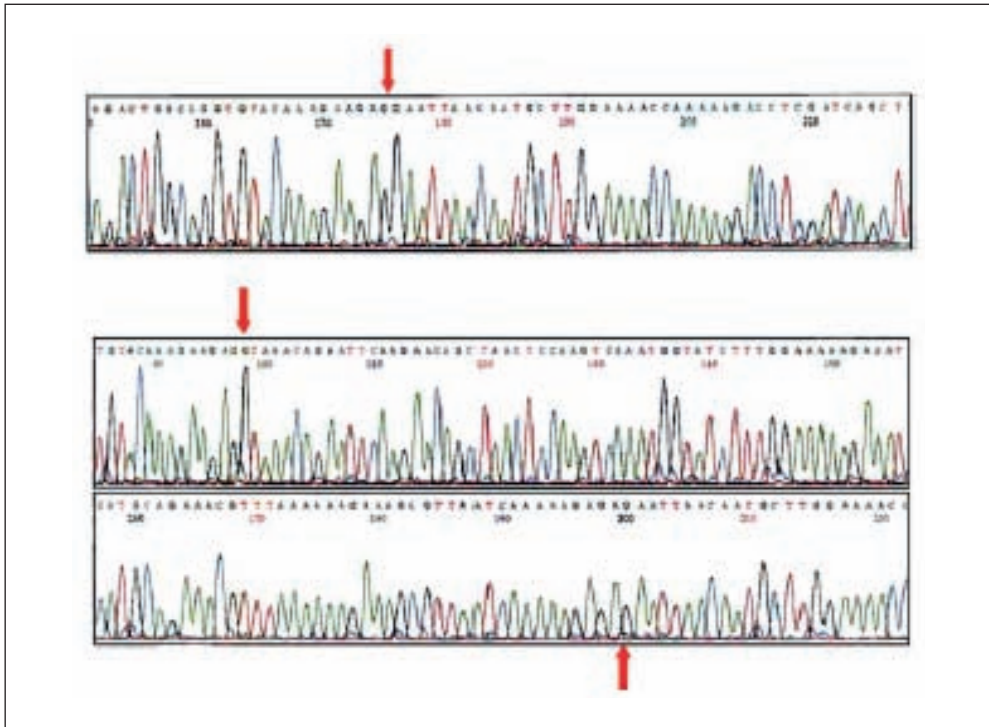


Abb. 4 Kurze, der Pfeil kennzeichnet die Stelle, wo eine 102 bp lange Deletion stattfindet (obere Reihe), und lange Form der Schweine-TFAM-mRNA (untere zwei Reihen) (nach MILOŠEVIĆ BERLIĆ et al. 2003)

die wir über komplexe Merkmale sammeln, sind oft sehr unterschiedlich und untereinander nicht direkt vergleichbar. So haben wir z. B. für die männliche Fruchtbarkeit Daten über Samenqualität, die normalerweise die Anzahl von Spermien, deren Mobilität und Befruchtungskapazität beinhalten, Daten von Mutationen in verschiedenen Genen, die sich in verminderter Befruchtungsfähigkeit widerspiegeln, Angaben über Entwicklungsstörungen des männlichen Genitaltrakts, die die Befruchtungsfähigkeit der Träger beeinflussen, Daten von Modellorganismen, die als Folge unterschiedlicher Mutationen verringerte Fruchtbarkeit aufweisen, epigenetische Daten usw. (Abb. 5).

Da so unterschiedliche Daten schwer zu vereinen und gemeinsam zu interpretieren sind, bietet sich als eine Möglichkeit an, diese Daten auf einer Chromosomenkarte zu integrieren, um einen besseren Überblick zu gewinnen (Abb. 6). So gewonnene Daten können dann für verschiedene bioinformatische Analysen verwendet werden, die eine komplexere Dateninterpretation ermöglichen. Dazu werden oft Programme verwendet, die auf kausalen Zusammenhängen zwischen Genen und Chromosomenregionen, auf Annotierungsdaten und bekannten Zusammenhängen zwischen Genprodukten beruhen.

Leider ist die Qualität der Genomannotierung noch immer relativ schlecht, und die Datensammlungen, die eine gegenseitige Verknüpfung von Genen, deren Produkten und deren Integration in komplexere Netzwerke ermöglichen, sind noch immer sehr mangelhaft. Andererseits bieten aber gerade solche Analysen die Identifizierung von Genen und Genprodukten,



Abb. 5 Durch die Evolution der Wirbeltiere erhaltene Bindungsstelle für die Mikro-RNA miR-27ab. Die Abkürzungen bedeuten: Bta: *Bos taurus*; Mmu: *Mus musculus*; Ocu: *Oryctolagus cuniculus*; Eeu: *Erinaceus europaeus*; Cfa: *Canis familiaris*; Dno: *Dasyurus novemcinctus*; Laf: *Loxodonta africana*; Mdo: *Monodelphis domestica*; Oan: *Ornithorhynchus anatinus* (nach KUNEJ et al. 2009).

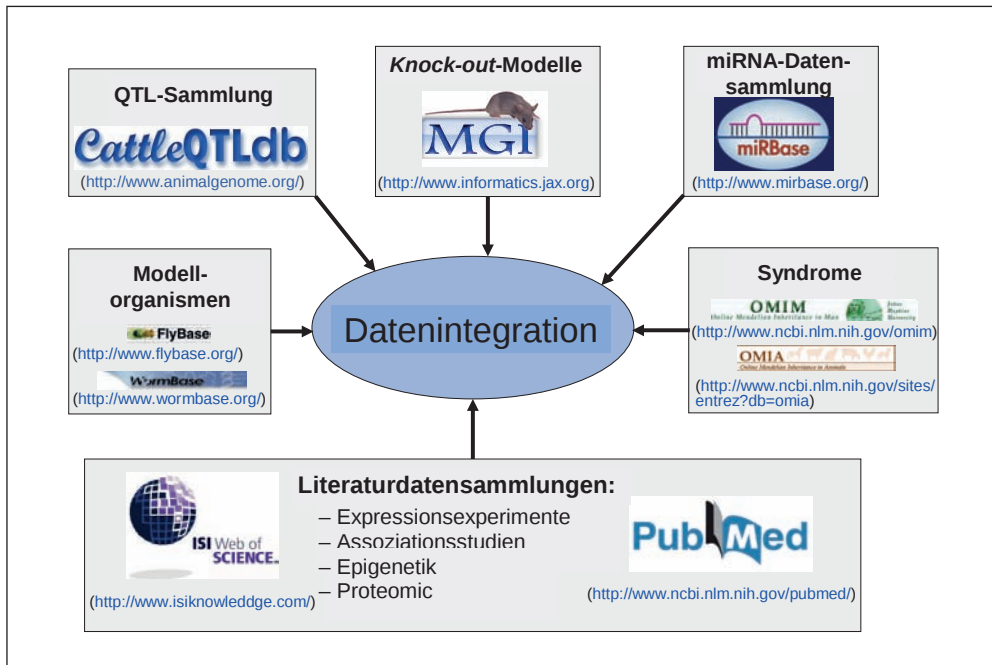


Abb. 6 Datenintegration aus unterschiedlichen Quellen: Artspezifische QTL-Sammlung (Cattle QTLdb), Maus-Knock-out-Modelle, miRNA-Datensammlung, Daten von Modellorganismen (*D. melanogaster*, *C. elegans*), Datensammlung von klinischen Merkmalen (OMIM; OMIA) und Literatur-Datensammlungen

die in bestimmten regulatorischen Wegen wichtige Rollen spielen, aber experimentell mit einzelnen Merkmalen noch nicht in Verbindung gebracht wurden (OGOREVC et al. 2011).

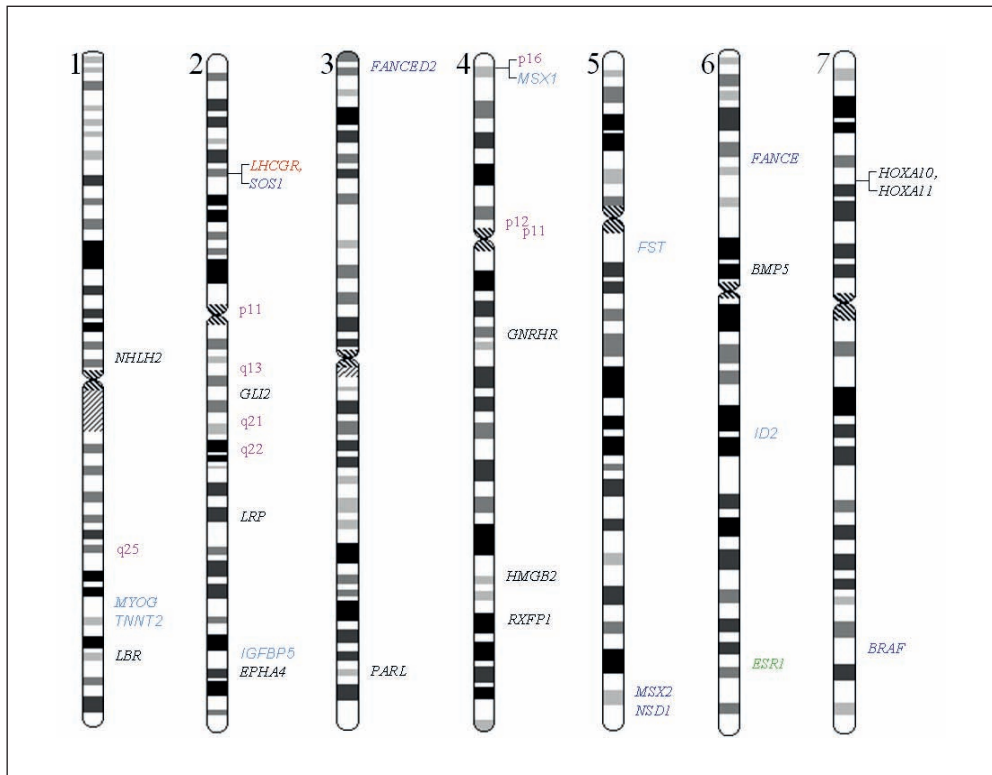


Abb. 7 Teil der menschlichen Chromosomenkarte mit Kandidatengenen für Kryptorchismus (Chromosomen 1–7). Die Daten aus unterschiedlichen Quellen sind mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet: Klinische Syndrome (blau), Knock-out- und Gentransfer-Experimente (Maus-Modelle) (schwarz), Chromosomenaberrationen (lila), Assoziationsstudien (grün), Expressionsexperimente (hellblau), assoziiert mit Kryptorchismus (unterschiedliche Studienansätze) (rot) (nach OGOREVC et al. 2009)

Gerade das ist eine wichtige Stärke solcher Analysen, die oft sogenannte *Missing links* aufdecken helfen. So können die Gene, die experimentell schwer zu identifizieren sind, mit solchen Netzwerkanalysen gefunden werden, darunter auch Gene mit wichtigen regulatorischen und Signalfunktionen. Unter zahlreichen Programmpaketen, die solche Analysen ermöglichen, ist die sogenannte IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) eine sehr oft verwendete Möglichkeit (JEMÉNEZ-MARÍN et al. 2009).

4. Sequenzdatenvergleich zwischen den Arten

Sequenzdatenvergleiche zwischen den Arten können besonders hilfreich sein, wenn man entweder feine Unterschiede zwischen Genprodukten bei verschiedenen Arten sucht oder gemeinsame Regulationsmechanismen für eine Genfamilie aufdecken möchte (Dovč et al. 2006). Ein Beispiel für die erste Fragestellung könnte der Sequenzvergleich von Kaseinen zwischen den Arten, unter besonderer Berücksichtigung der potenziellen Antigenwirkung

einigen Milcharten, sein. Ein gutes Beispiel dafür ist der Vergleich der Kaseinsequenzen verschiedener Arten und derer potenziellen Immunogenität für den Menschen. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Kaseine verschiedener Säugetierarten zeigt, dass die höchste Sequenzähnlichkeit auf der Aminosäureebene zwischen Mensch und Pferd besteht, wodurch sich auch die wesentlich niedrigere Immunogenität der Pferdemilch im Vergleich mit der Milch von Wiederkäuern für den Menschen ergibt. Dadurch lässt sich auch die empirische Beobachtung erklären, dass Kinder, die auf Kuh- oder Ziegenmilch allergisch reagieren, oft keine Reaktion auf Stutenmilch zeigen. Höchstwahrscheinlich sind in Wiederkäuermilch einige Oligopeptide mit immunogener Wirkung enthalten, die in der Stutenmilch fehlen.

Tab.1 Vergleich der Gensequenzen und Aminosäuresequenzen der Kaseine von Kamel, Schwein, Mensch, Rind, Schaf und Ziege mit Pferdesequenzen. Die Ähnlichkeit der Sequenzen ist ausgedrückt in Prozenten.

Pferd	α_{s1} (%)	α_{s1} -Protein (%)	β (%)	β -Protein (%)	κ (%)	κ -Protein (%)
Kamel	7	4	7	5	8	6
Schwein	7	4	7	5	8	6
Mensch	7	5	7	5	8	6
Rind	7	3	7	5	7	5
Schaf	6	3	7	5	7	6
Ziege	7	4	7	5	7	5

Andererseits zeigt der Vergleich der Promotorregionen der Laktoproteingene auffallende Ähnlichkeiten, die eine Überlegung in die Richtung des universellen Laktoproteinpromotors möglich machen (HOBOR et al. 2008). Die Bindungsstellen für spezifische Transkriptionsfaktoren, die über eine gewebespezifische und hormonal abhängige Genexpression entscheiden, können in den meisten Promotoren der Laktoproteingene gefunden werden (Abb. 8).

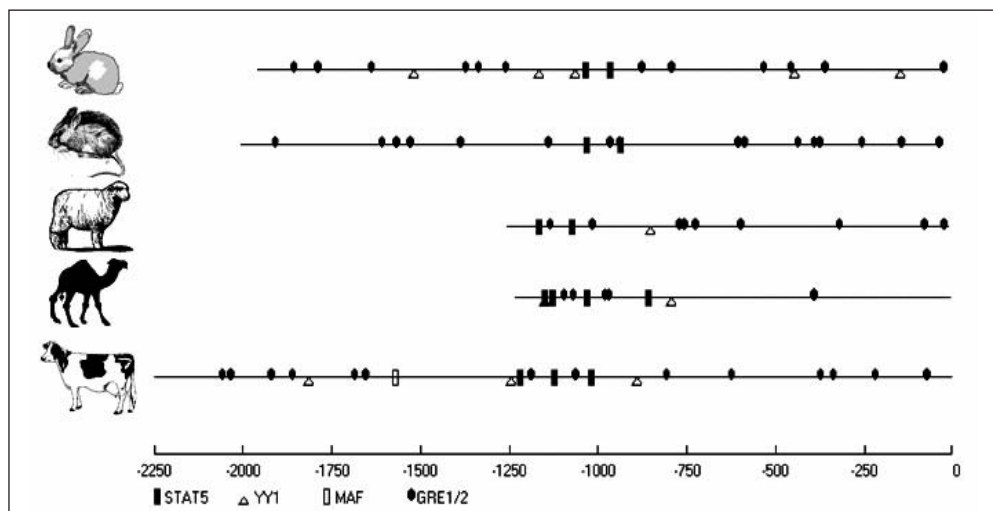


Abb. 8 Schematische Darstellung der Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den Promotorregionen des κ -Kasein-Gens (CSN3) bei verschiedenen Säugetierarten

Wie schon vorher angedeutet, sind Vergleiche der Genstruktur zwischen den Arten sehr hilfreich bei der Entdeckung der verschiedenen Prozessierungsvarianten der mRNAs. Hier werden wir an einem Beispiel der mRNA-Prozessierung des α_{s1} -Kaseingentranskriptes bei der Stute erläutern, wie man die Konservierung der *Splice*-Stellen für die Strukturanalyse verwenden kann. Für die vorausgesagte Exon/Intron-Struktur wurden Primerpaare konstruiert und unterschiedliche Längen der Transkripte untersucht. In der Abbildung 9 ist der alternative Ausschluss der Exons 8 und 15 im α_{s1} -Kaseingentranskript dargestellt.

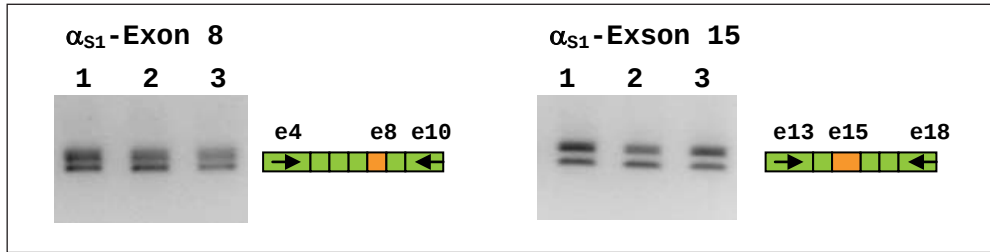


Abb. 9 Alternativer Ausschluss der Exons 8 und 15 im α_{s1} -Kaseingentranskript, getestet mit zwei Primerpaaren, die die Exons 8 und 15 im primären Transkript überbrücken.

5. Vergleichende Funktionsanalyse

Die Entdeckung eines Regulationselementes, wie z. B. des *Splice*-Elementes, dass auch auf große Distanz eine überzeugende Wirkung auf die *Splice*-Maschinerie ausübt, hat in verschiedenen Systemen (*In-vitro*-Systeme, tierische und menschliche Zellkulturen) einen universellen Einfluss auf das Regime der mRNA-Prozessierung gezeigt (LENASI et al. 2006). Diese universelle Wirkung unterstützt die relativ neue Hypothese, dass mRNA-Prozessierung nicht posttranskriptionell, sondern kotranskriptionell stattfindet (Abb. 10).

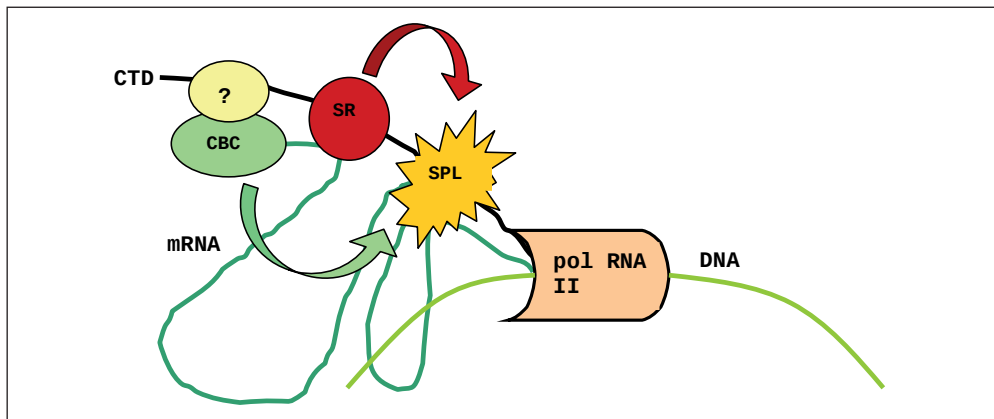


Abb. 10 Die räumliche Nähe des Regulationselementes im Intron I und im Promotor ist Voraussetzung für die Steuerung der mRNA-Prozessierung durch proximale Promotorelemente. Das impliziert, dass mRNA-*Splicing* kotranskriptionell erfolgt (LENASI et al. 2006).

6. Gen- und Merkmalsontologie

Die Ontologie der Gene und Merkmale ist bei der Interpretation der genomischen Daten von zentraler Bedeutung. Oft sind biologische Funktionen einzelner Gene nur spärlich bekannt und verhindern deswegen eine komplexere Vernetzung einzelner Gene in komplexeren Netzwerken. Wie mangelhaft die Genannotierung auch bei den Arten mit vollständig sequenziertem Genom sein mag, zeigt die Tatsache, dass im Rindengenom nur 22 Gene mit einer so komplexen Eigenschaft wie Laktation verbunden sind (LEMAÏ et al. 2009). Deswegen ist es erforderlich, den wesentlichen Aufwand in die Verbesserung der Genannotationen zu investieren und damit die Aussagekraft der bioinformatischen Werkzeuge zu verbessern.

7. Grafische Integration von genomischen Daten

Da die genomischen Daten oft fragmentiert sind und aus unterschiedlichen Quellen, die nicht unbedingt direkt vergleichbar sind, stammen, bietet sich als ein gemeinsamer Nenner für die Dateninterpretation an, sie in eine komplexe Genkarte zu integrieren und aus der Kolokalisation der verschiedenen Evidenzen auf die funktionelle Bedeutung der einzelnen Genregionen zu schließen. Bei dieser Strategie sind die Regionen, die multiple (oft aus sehr unterschiedli-

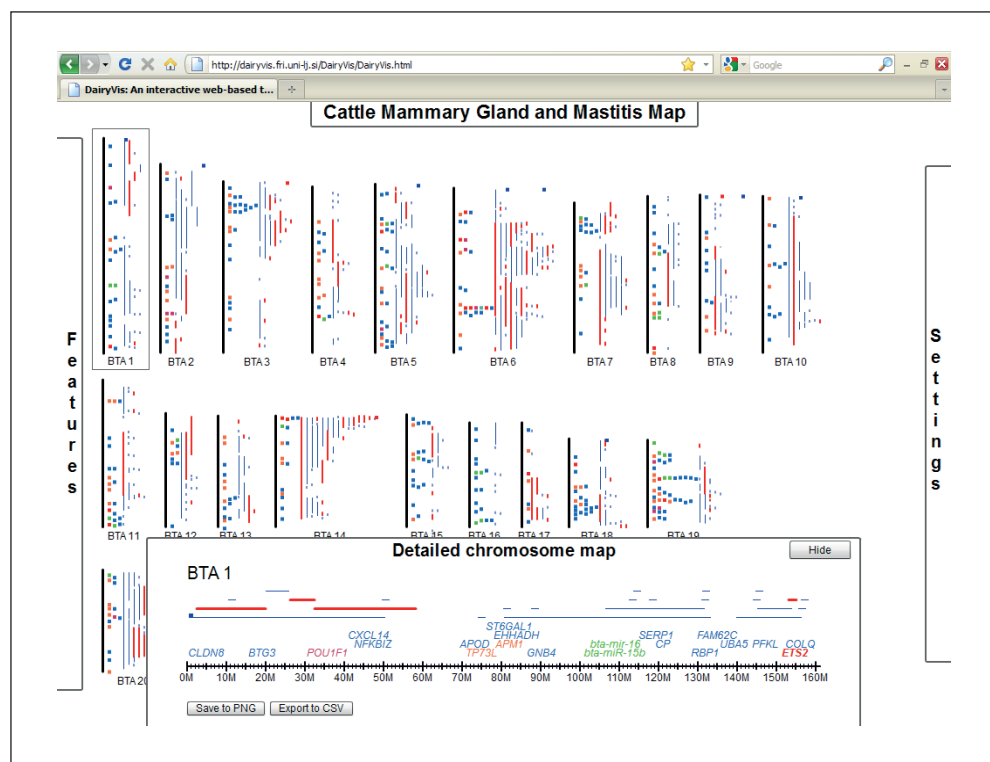


Abb. 11 Beispiel der Genkarte des Rinderchromosoms Nr. 1 mit eingetragenen kodierenden Regionen (blau), Markern (violett) und miRNA-Genen (grün), die mit Laktationseigenschaften verbunden sind.

chen Quellen stammende) Hinweise beinhalten, vielversprechend. Solche Regionen sind für die Forscher oft ein Hinweis darauf, wo eine detailliertere Analyse angebracht sein könnte. In unserem Labor haben wir eine integrierte Datensammlung, die Daten aus unterschiedlichen Quellen einschließt, aufgestellt und mit einem graphischen Interface die Darstellung dieser Informationen auf der Genkarte ermöglicht. Die Applikation steht unter dem Namen DairyVis (<http://dairyvis.biolaab.si/DairyVis/DairyVis.html>) den Laktationsforschern im Internet zur Verfügung. Diese Darstellung bietet einen holistischen Zugang zu einer komplexen Interpretation der genetischen Architektur der Laktationsmerkmale. Ein Ausschnitt aus der Datenbank ist in der Abbildung 11 dargestellt.

8. Zukunftserwartungen

Es ist zu erwarten, dass die Fülle der genomischen Informationen in den kommenden Jahren ungemein wachsen wird und dass der Bedarf nach immer aussagekräftigeren bioinformatischen Werkzeugen ständig zunehmen wird. Die Integration des funktionellen Wissens über Genfunktionen und die ständig wachsende Anzahl an für die Genfunktion bedeutenden Mutationen wird es ermöglichen, die Identifizierung der wichtigsten genomischen Varianten, die einen großen Teil der genetischen Variation verursachen, zu erklären. Bei allen partiellen Verknüpfungen zwischen einzelnen Genen wird die holistische, komplexe Strategie für die Interpretation der Genomfunktion noch immer eine zentrale Rolle spielen. Am Ende muss noch einmal ausdrücklich betont werden, dass auch noch so komplexe bioinformatische Voraussagen nicht die unumgängliche funktionale Überprüfung der Zusammenhänge im lebenden Organismus oder in entsprechenden Zellmodellen ersetzen werden können.

Literatur

- DOVČ, P., LENASI, T., FRAJMAN, P., RAZPET, A., HOBOR, S., DEBELJAK, M., and KUNEJ, T.: Genomic Approach to Lactation Improvement in Farm Animals. Belo Horizonte, MG, (Brasil). 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13–18 (2006)
- HOBOR, S., KUNEJ, T., and DOVČ, P.: Polymorphisms in the kappa casein (CSN3) gene in horse and comparative analysis of its promoter and coding region. *Anim. Genet.* 39/5, 520–530 (2008)
- JIANG, Z., KUNEJ, T., MICHAL, J. J., GASKINS, C. T., REEVES, J. J., BUSBOOM, J. R., DOVČ, P., and WRIGHT, R. W. Jr.: Significant associations of the mitochondrial transcription factor. A promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 334, 516–523 (2005)
- JIMÉNEZ-MARÍN, Á., COLLADO-ROMERO, M., RAMÍREZ-BOO, M., ARCE, C., and GARRIDO, J. J.: Biological pathway analysis by ArrayUnlock and Ingenuity Pathway Analysis. *BMC Proceedings* 3/Suppl. 4, S6 (2009)
- KUNEJ, T., OGOREVC, J., and DOVČ, P.: Search for cryptorchidism candidate genes: a comparative genetic approach. 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany August 1–6, 2010. *Proceedings. Leipzig: Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften, cop.* 2010, PP4-132, 0855 (2010)
- KUNEJ, T., WU, X.-L., MICHAL, J. J., MILOSEVIC BERLIC, T., JIANG, Z., and DOVČ, P.: The porcine mitochondrial transcription factor a gene: Molecular characterization, radiation hybrid mapping and genetic diversity among 12 pig breeds. *Amer. J. Anim. Veterin. Sci.* 4/4, 129–135 (2009)
- LENASI, T., PETERLIN, M. B., and DOVČ, P.: Distal regulation of alternative splicing by splicing enhancer in equine β -casein intron 1. *RNA (Camb., Print)* 12, 1–10 (2006)
- LEMAY, D. G., LYNN, D. J., MARTIN, W. F., NEVILLE, M. C., CASEY, T. M., RINCON, G., KRIVENTSEVA, E. V., BARRIS, W. C., HINRICHS, A. S., MOLENAAR, A. J., POLLARD, K. S., MAQBOOL, N. J., SINGH, K., MURNEY, R., ZDOBNOV, E. M., TELLAM, R. L., MEDRANO, J. F., GERMAN, J. B., and RIJNKELS, M.: The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk. *Genome Biology* 10, R43 (2009)

- MILOŠEVIČ BERLIČ, T., MILISAV, I., and DOVČ, P.: Porcine TFAM is an important player in mitochondrial biogenesis. In: JAVORNIK, B., and LUTHAR, Z. (Eds.): *Proceedings of Genetika 2003*; pp. 56–57. Ljubljana: Genetic Society of Slovenia 2003
- OGOREVC, J., DOVČ, P., and KUNEJ, T.: Comparative genomics approach to identify candidate genetic loci for male fertility. *Reprod. Domest. Anim.* *46/2*, 229–239 (2011)
- OGOREVC, J., KUNEJ, T., RAZPET, A., and DOVČ, P.: Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Anim. Genet.* *40/6*, 832–851 (2009)
- The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium*, and ELSIK, C. G.: The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* *324/5926*, 522–528 (2009)

Prof. Peter Dovč, PhD
Head of the Genetic Laboratory
University of Ljubljana
Biotechnical Faculty
Department of Animal Science
Groblje 3
SI-1230 Domžale
Slovenia

Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta
Jamnikarjeva 101
SI-1000 Ljubljana
Slovenia

Y-chromosomale Vererbung

Barbara WALLNER und Gottfried BREM ML, kMÖAW (Wien, Österreich)

Mit 4 Abbildungen

Zusammenfassung

Das Y-Chromosom ist das kleinste Chromosom und liegt bei männlichen Plazentatieren in jeder Zelle in einfacher Kopie vor. Mit Ausnahme der pseudoautosomalen Region rekombiniert es während der Meiose nicht und wird rein paternal vererbt. Da es, abgesehen von spontanen Mutationen, unverändert vom Vater an den Sohn weitergegeben wird, können variable Y-chromosomale Marker beim Menschen und den Haussäugetieren zur Charakterisierung paternaler Linien verwendet und väterlich vererbte Y-chromosomale Haplotypen der rein matrokin vererbten mitochondrialen DNA (mtDNA) gegenübergestellt werden. In der Pferdezucht sind väterliche Stammbäume mit wenigen Gründertieren von besonderer Bedeutung. So geht die Population der heutigen Lipizzaner im Wesentlichen auf nur 8 Gründerhengste, deren Linien bis heute die Lipizzaner repräsentieren, zurück. Die Untersuchung von 16 Lipizzanerhengsten und 49 Hengsten aus 32 weiteren Pferderassen ergab jedoch für alle Tiere denselben Y-chromosomalen Haplotyp. Das Pferd weist als einzige Haustierspezies die genetische Besonderheit auf, dass am Y-Chromosom außerhalb der pseudoautosomalen Region keine Variabilität nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu wurden bei allen Pferderassen sehr viele mtDNA-Varianten detektiert. Das Phänomen eines monomorphen Y-Chromosoms bei gleichzeitig hoher mitochondrialer Variabilität, lässt sich durch ein starkes Geschlechtsungleichgewicht zugunsten der Stuten während der Entstehungsgeschichte des Pferdes und in der modernen Pferdezucht erklären.

Abstract

The Y chromosome has useful properties for studies of molecular evolution. Except for the pseudoautosomal region it is inherited paternally and does not recombine. It can be used to construct patrilineal genealogy cladograms complementary to those based on maternally inherited mitochondrial DNA. Paternal lines play an important role in animal especially in horse breeding. 8 lines originating from founder stallions of different breeds have been established during the Lipizzan breed's history. But a screening for single-nucleotide polymorphisms and Y-chromosomal microsatellite variation in 16 Lipizzan stallions and 49 stallions from 32 further breeds identified only a single horse Y-chromosomal haplotype. Y-chromosomal uniformity contrary to extensive matrilinear diversity in the domestic horse can be explained by a strong sex-bias in the domestication process and in modern horse breeding.

1. Y-Chromosom

1.1 Evolution

Der genetische Mechanismus, der das Geschlecht beim Menschen und bei unseren Haussäugetieren bestimmt, ist sehr einfach. Die Ausprägung des Geschlechts ist bei diesen Spezies chromosomal determiniert. Der autosomale Chromosomensatz ist bei allen Individuen gleich aufgebaut. Der geschlechtsspezifische Unterschied liegt in den Gonosomen (auch als

Heterochromosomen bezeichnet): Weibliche Tiere haben zwei X-Chromosomen, männliche hingegen ein X- und ein Y-Chromosom.

Das männliche Geschlechtschromosom bzw. die chromosomale Geschlechtsfixierung hat sich aus einem gleichwertigen Paar von Autosomen entwickelt. Ausgehend vom gemeinsamen Vorfahren von Plazenta- und Beuteltieren kam es vor 160 Millionen Jahren zur Evolution eines dominanten geschlechtsbestimmenden Gens an einem Chromosom. Auf dem längeren Arm des einen X-Chromosoms entwickelte sich das geschlechtsbestimmende SRY-Gen (*Sex determining region of Y*). In und um die geschlechtsdeterminierende Region kam es zum Verlust der Rekombination mit dem homologen Geschwisterchromosom und in der Folge zur Differenzierung der beiden Chromosomen. Das Y-Chromosom verlor infolge von Deletionen zunehmend an Größe und durch Fehlen der Rekombination kam es zur Anhäufung von inaktiven Genen und repetitiver DNA (RICE 1996).

Die pseudoautosomale Region von X- und Y-Chromosom ist ein homologer Bereich, in dem die Geschlechtschromosomen rekombinieren. Diese Rekombination ist sehr wichtig für die exakte Paarung der Geschlechtschromosomen während der Meiose (RAUDSEPP und CHOWDHARY 2008).

Unabhängig von den Plazentariern ist das XY-System auch in anderen Organismen evolviert. Analoge Abfolgen sind bekannt bei *Drosophila*, Vögeln und Fischen.

1.2 Genom

Das Y-Chromosom der Haussäugetiere und des Menschen ist ein sehr kleines Chromosom. Es besteht zur Hälfte aus kondensiertem Heterochromatin. Das Euchromatin des Y-Chromosoms macht etwa 1 % des haploiden Genoms aus.

Bei Mensch (SKATELSKY et al. 2003), Maus (GREGORY et al. 2002), und Schimpanse (HUGHES et al. 2010) ist die gesamte Sequenz des Y-Chromosoms publiziert. Obwohl die DNA-Sequenz von Autosomen und des X-Chromosoms bei den Haussäugetieren schon vollständig sequenziert ist, fehlt sie vom Y-Chromosom. Durch die repetitive Struktur des Y-Chromosoms gestaltet sich das Alignment nach dem konventionellen Sequenzieren schwieriger als bei den restlichen Genomabschnitten. Die Euchromatinregion des humanen Y-Chromosoms beinhaltet auf einer Länge von 30 Mb 27 verschiedene Gene.

Nach SKATELSKY et al. (2003) werden die Y-chromosomalen Gene des Menschen in drei Klassen eingeteilt. Die erste Gruppe bilden 16 X-degenerierte Gene, die meist ubiquitär exprimiert werden und als Einzelkopien vorliegen. Die zweite Gruppe bilden die „Ampliconic-Genes“. Das sind 9 Genfamilien, die mit 60 verschiedenen Transkripten hauptsächlich im Hoden exprimierte Gene für die Spermatogenese vertreten. Zu erwähnen ist noch eine Gruppe mit zwei X-transponierten Genen.

Nur wenige Gene, die in der Euchromatinregion des Y-Chromosoms des Menschen liegen, sind auch bei Maus, Pferd oder Schwein dort zu finden (RAUDSEPP et al. 2004). Das Y-Chromosom unterscheidet sich hinsichtlich der Genzusammensetzung sehr stark bei den verschiedenen Spezies (Abb. 1). Infolge der fehlenden Rekombination und oftmaliger ektopischer Integrationen evolviert das Y-Chromosom schneller und anders als die Autosomen und das X-Chromosom. Während sich 98 % der autosomalen Genomsequenzen von Mensch und Schimpanse problemlos alignen lassen, sind es am Y-Chromosom nur 70 % (HUGHES et al. 2010). Eine Reorganisation der Gene kommt bei den Autosomen im Prinzip zwar auch vor, aber nicht im selben Ausmaß.

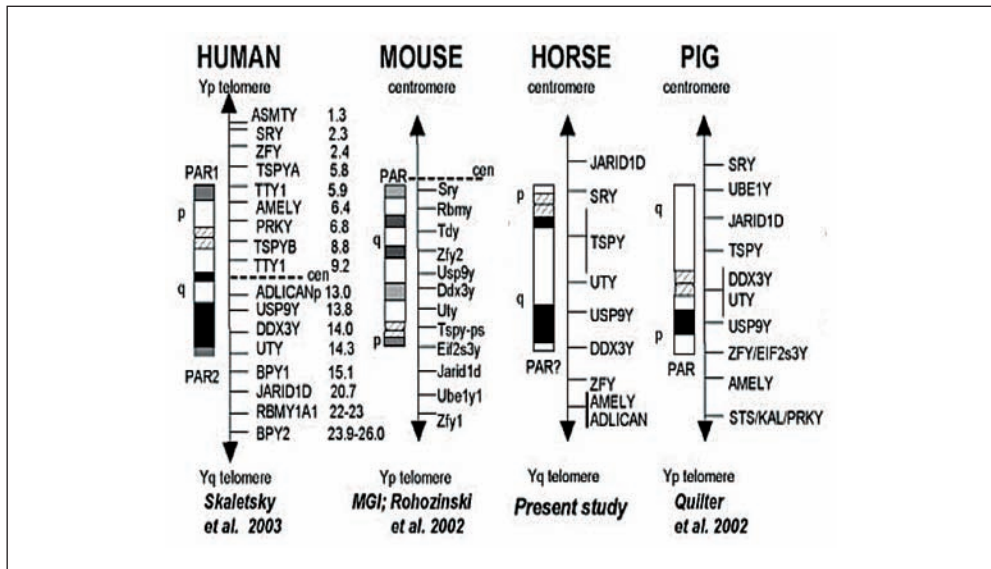


Abb. 1 Y-chromosomale Gene bei Mensch, Maus, Pferd und Schwein (nach RAUDSEPP et al. 2004)

2. Vererbung von Y-Chromosom und mitochondrialer DNA

Bei der Befruchtung einer Eizelle kommt es mit dem Verschmelzen der beiden Gameten zur Syngamie und damit zur Vereinigung des haploiden Chromosomensatzes des Vaters und des haploiden Chromosomensatzes der Mutter zum diploiden Chromosomensatz der Zygote. Der genetische Beitrag des Spermiums unterscheidet sich von dem der Eizelle in zwei wesentlichen Punkten:

- Vom Spermium wird bei der Hälfte aller Befruchtungen das männliche Geschlechtschromosom, das „Y-Chromosom“, übertragen und damit das Geschlecht des Nachkommen chromosomal determiniert.
- Das Spermium überträgt keine väterliche mitochondriale DNA (mtDNA) auf das neue Individuum. Die mtDNA wird rein matrokin, d.h. ausschließlich von der Mutter weitergegeben bzw. vererbt. Die wenigen väterlichen Mitochondrien, die an der Bildung des Spermiums (Mittelstück) beteiligt sind, werden in der frühen Embryogenese lysiert, so dass keine mtDNA vom Vater auf den Nachkommen vererbt wird (SUTOVSKY et al. 1999).

Während sich der autosomale Genotyp eines Individuums aufgrund von Segregation zu gleichen Anteilen aus dem der beiden Elterntiere zusammensetzt, stammt der mitochondriale Genotyp der männlichen und weiblichen Nachkommen ausschließlich von der Mutter und der Y-chromosomale Genotyp eines männlichen Individuums ausschließlich vom Vater. Weder das mitochondriale Genom noch das Y-Chromosom rekombinieren während der Meiose. Beide Genome werden demzufolge, abgesehen von zufälligen Einzelmutationen, unverändert an die Nachkommen weitergegeben. Aufgrund der fehlenden Rekombination werden mitochondriale und Y-chromosomale Genotypen eines Individuums als Haplotypen bezeichnet.

Infolge der Besonderheiten der Vererbung mitochondrialer und Y-chromosomaler DNA lassen sich verwandtschaftliche Linienbeziehungen anhand dieser Moleküle über viele Generationen hinweg verfolgen. Dies kann selbst dann gelingen, wenn in verschiedenen Generationen Ahnen fehlen bzw. deren DNA nicht mehr für eine Analyse zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu benötigt die molekular-genealogische Analyse auf autosomaler Basis für eine zuverlässige Abstammungssicherung in der Regel alle zwischen Vorfahren und Proband aufgetretenen Ahnen, da durch die zufällige Neuverteilung und Rekombination von Autosomen während der Meiose die Verwandtschaftsbeziehungen schnell „verwischt“ werden (Abb. 2).

Der gleichsam klonale, d. h. nicht durch Rekombination beeinflusste Vererbungsmechanismus führt dazu, dass sich alle gegenwärtig beobachteten mitochondrialen Genotypen einer Art auf einen mütterlichen, alle Y-chromosomalen auf einen väterlichen Vorfahren zurückführen lassen. Durch Mutationen entstehen immer neue Varianten (Allele), und unter der Hypothese einer „Molekularen Uhr“ ist die molekulare Evolutionsrate über die Zeit konstant (KING und JUKES 1969). Deshalb versucht die molekulare Anthropologie mit Hilfe mitochondrialer und Y-chromosomaler Marker, Fragen zum Ursprung des modernen Menschen zu klären.

2.1 Polymorphismen am Y-Chromosom

Als polymorpher genetischer Marker wird jeder DNA-Abschnitt bezeichnet, der zwei oder mehr Allele in einer Population zeigt.

2.1.1 Basensubstitutionen

Unterschiede zwischen Allelen auf Grund von Basenaustauschen werden als *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) bezeichnet. Allerdings treten Basensubstitutionen bei einer Mutationsrate von $2\text{--}3 \times 10^{-8}$ pro Base pro Generation relativ selten auf (XUE et al. 2009). Infolgedessen eignen sich Y-chromosomale SNP-Markersysteme gut für die Untersuchung von Fragestellungen bezüglich phylogenetischer Beziehungen zwischen verschiedenen Arten. Zur Analyse historischer Prozesse, wie der Entwicklung von verschiedenen Nutztierassen innerhalb einer Spezies, die sich über einen vergleichsweise kurzen Zeitraum erstrecken, oder der Unterscheidung paternalen Linien, sind SNPs aber nur sehr eingeschränkt nutzbar. Für diese Untersuchungen sind DNA-Mikrosatellitenmarker, die eine wesentlich höhere Auflösungskraft haben, ein weit besser geeignetes System (ROEWER et al. 1996).

2.1.2 DNA-Mikrosatelliten

Bei repetitiv aufgebauten DNA-Mikrosatelliten unterscheiden sich die Allele nicht durch Einzelbasenaustausche, sondern durch Längenunterschiede repetitiver Bereiche. Die Mutationsrate von DNA-Mikrosatelliten ist mit 10^{-3} bis 10^{-4} pro Meiose um ein Vielfaches höher als das Auftreten von Basensubstitutionen (KING und JOBLING 2009). Dies begünstigt die Entstehung neuer Allele. Der hohe Polymorphiegrad, die große Anzahl von bis zu 100 000 Loci im Genom von Vertebraten und die einfachen Analysemethoden führten dazu, dass DNA-Mikrosatelliten in den letzten Jahren auf vielen Gebieten der Genetik zu einem bevorzugten Markersystem wurden (GOLDSTEIN und SCHLÖTTERER 1999).

Y-chromosomale DNA-Mikrosatelliten sind genauso polymorph wie autosomale und eignen sich daher sehr gut zur Untersuchung paternalen Linien in einer Population (HEYER

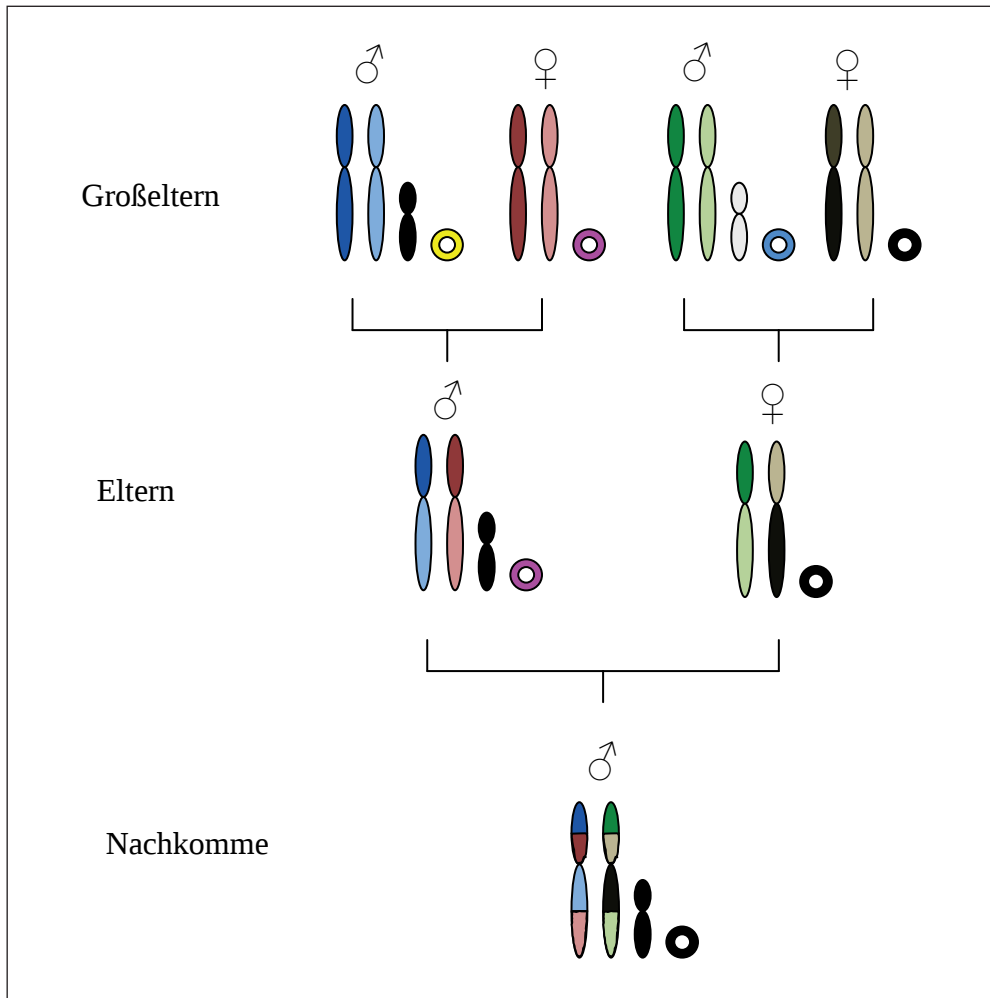


Abb. 2 Schematische Darstellung der Vererbung autosomaler, Y-chromosomaler und mitochondrialer DNA-Sequenzen. Autosomale Sequenzen (großes Chromosomenpaar) rekombinieren bei jeder Generation, Y-chromosomale (kleines Chromosom) und mt-DNA (Ring) hingegen nicht. Folglich besitzt ein Individuum (unten) autosomale Gene von vielen Vorfahren. Die nicht rekombinierende Region des Y-Chromosoms und die mitochondriale DNA leiten sich hingegen nur von jeweils einem Elterntier ab.

et al. 1997). Mittels Analyse variabler Y-chromosomaler DNA-Mikrosatelliten-Marker beim Menschen konnten patrilineale Genealogien konstruiert werden, die bestimmte Vererbungstraditionen in ethnischen Gruppen, wie z. B. die Weitergabe von Namen (HILL et al. 2000) oder Ämtern (SKORECKI et al. 1997), in der väterlichen Linie widerspiegeln. Die Überprüfung von väterlichen Stammbäumen, die einige Generationen zurückreichen, ist mittels Analyse variabler Y-chromosomaler Marker möglich (FOSTER et al. 1998). Y-chromosomale DNA-Mikrosatelliten sind in der Abstammungskontrolle speziell dann hilfreich, wenn keine DNA-Probe des potentiellen Vaters eines männlichen Individuums zur Verfügung steht. In solchen

Fällen kann die Untersuchung des Y-chromosomalen Genotyps eines paternalen Verwandten des Vaters zur Abstammungsverifizierung herangezogen werden (KAYSER et al. 2000).

2.2 Darstellung von Populationsstrukturen mit Y-chromosomalen und mitochondrialen Markern

Die Anzahl der Y-chromosomalen und mitochondrialen Haplotypen und deren Allelfrequenzen in Subpopulationen liefern Informationen zur Populationsstruktur. Die Verteilung der Haplotypen in Populationen ist abhängig von

- der bis zum letzten gemeinsamen Vorfahren verstrichenen Zeitspanne,
- der Mutationsrate der Marker und
- der effektiven Populationsgröße der Gruppe.

Für das Y-Chromosom und die mtDNA entspricht die effektive Populationsgröße der Anzahl der männlichen und weiblichen Tiere, die Nachkommen produzieren (HARTL und CLARK 1989).

Die Verteilung maternaler und paternaler Linien innerhalb einer Population liefert wesentliche Informationen zur Entstehungsgeschichte. Die unterschiedlichen Haplotypen, die innerhalb einer Population oder Rasse vorhanden sind, geben Einblick in die demografische Entwicklung. Auch können daraus Erkenntnisse über das Paarungsverhalten und geschlechtsspezifisches Migrationsverhalten von Tieren sowie über Änderungen in der Populationsgröße im Laufe der Generationen gewonnen werden. Wie schon erwähnt, können zudem mit rein maternal und paternal vererbten DNA-Markern auch weit zurückreichende Stammbäume überprüft werden.

Deshalb können Untersuchungen Y-chromosomaler und mitochondrialer Varianten bei Haustieren wertvolle Informationen zur Domestikationsgeschichte und Rasseentstehung liefern, wie bei Schwein (RAMIREZ et al. 2009), Schaf (MEADOWS et al. 2006), Hund (SUNDQVIST et al. 2006) und Rind (KANTANEN et al. 2009) bereits gezeigt worden ist.

3. Y-chromosomale Untersuchungen beim Pferd

Väterliche Stammbäume mit wenigen Gründertieren sind typisch für viele Haus- und Nutztierassen. So geht die Population der heutigen Lipizzaner im Wesentlichen auf nur 8 Gründhengste – unterschiedlicher Herkunft – zurück (LEHRNER 1982).

Diese 8 Hengstlinien des alten Lipizzaners prägen die Lipizzanerzucht entscheidend. An Hand der Gestütsbücher, die seit 1701 vorliegen, kann jeder heute lebende Lippizanerhengst lückenlos bis zu seinem Stammvater zurückverfolgt werden. Beim Lipizzaner erhalten männliche Jungtiere traditionell den Liniennamen des Vaters. Der Sohn eines Conversano trägt wieder den Namen Conversano, jeder männliche Nachkomme eines Favory bleibt ein Favory (Abb. 3).

In Analogie zu anderen Nutztierassen haben wir deshalb untersucht, ob sich die paternalen Linien beim Lipizzaner mit Hilfe variabler genetischer Marker auf dem Y-Chromosom nachvollziehen lassen.

3.1 Charakterisierung der Lippizanerstämme mit Y-chromosomalen Markern

Zur genetischen Differenzierung der Hengstlinien beim Lipizzaner wurden erstmals Y-chromosomale DNA-Abschnitte beim Pferd gezielt isoliert (WALLNER 2001). Insgesamt 6 DNA-Abschnitte mit einer Gesamtlänge von 2638 bp wurden bei jeweils einem der heute lebenden

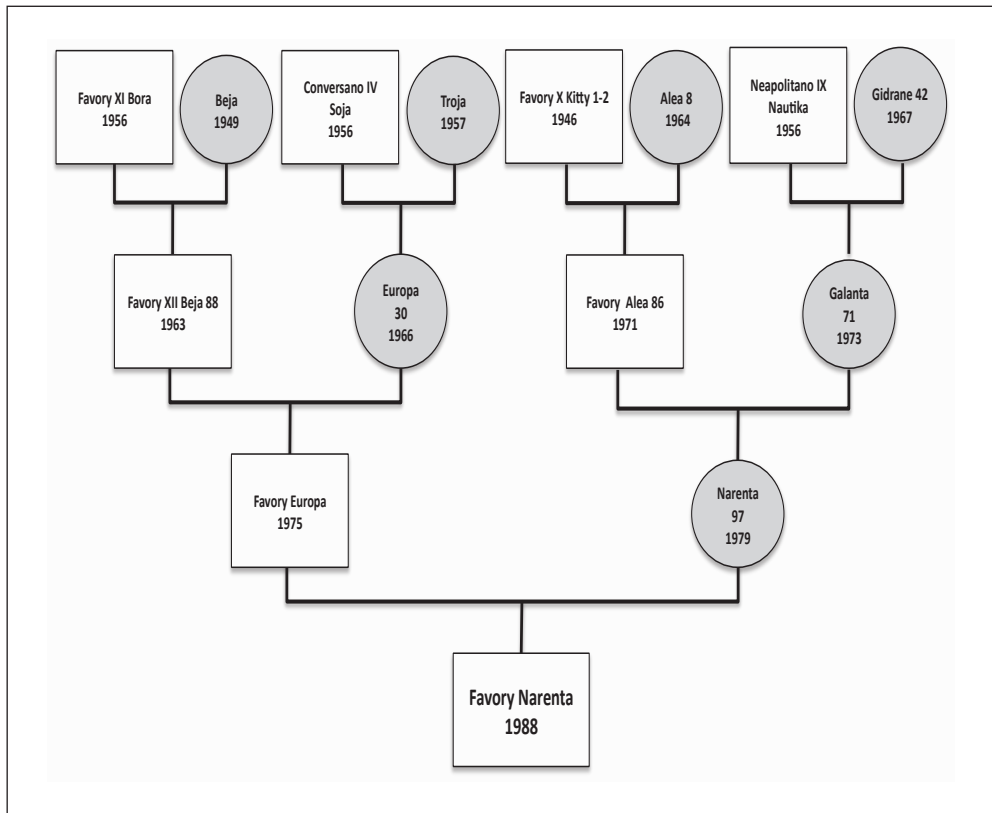


Abb. 3 Stammbaum von Favory Narenta 1988 (männliche Pferde weiß, weibliche Pferde grau markiert)

Vertreter der 8 Hengstlinien des Lipizzaners sequenziert. Es wurde jeweils ein Hengst jeder Hengstlinie sequenziert. Bei allen Tieren wurde eine identische Sequenz gefunden. Obwohl also die Gründerhengste der Lipizzanerpopulation aus zum Teil sehr unterschiedlichen Rassen und geographisch entfernten Gegenden stammen, konnten zwischen den heute lebenden Vertretern der einzelnen Linien überraschenderweise keine Sequenzunterschiede in den untersuchten Bereichen des Y-Chromosoms detektiert werden.

Zwischen Pferd und Przewalskipferd (2 Punktmutationen) beziehungsweise Pferd und Esel (44 Punktmutationen) wurden hingegen Unterschiede gefunden (WALLNER et al. 2003).

Da Punktmutationen nicht das geeignete Markersystem zur Differenzierung von Hengstlinien zu sein schienen, haben wir 6 Y-chromosomale Mikrosatellitenmarker isoliert (WALLNER et al. 2004). Aber auch mit Hilfe der analysierten Mikrosatelliten, die aufgrund ihrer höheren Mutationsrate ein besser geeignetes Markersystem sind, konnten keine Unterschiede zwischen den Vertretern der heute lebenden Hengste verschiedener Linien festgestellt werden. Alle untersuchten Tiere hatten denselben Haplotyp (siehe Abb. 4).

Eine Erklärung dieser beobachteten Monomorphie am Y-Chromosom des Lipizzaners könnten Fehler im Pedigree der Lipizzaner sein, indem die heute lebenden Tiere nicht mehr den Y-chromosomalen Genotyp des Gründerhengstes repräsentieren. Auch eine – unerwar-

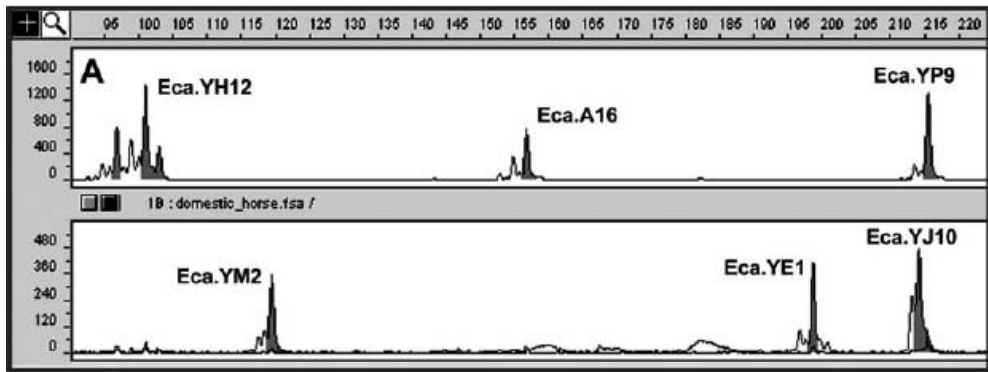


Abb. 4 Amplifikationsprofil der Y-chromosomalen Mikrosatelliten bei allen untersuchten Lipizzanerhengsten: Die schwarzen Spitzen zeigen die Allellänge des Mikrosatelliten. Der Mikrosatellit Eca.A16 hat somit ein Allel mit der Länge 157. Eca.YH12 liegt in dreifacher Kopienzahl am Y-Chromosom vor, und jeder Genort hat eine andere Länge (nämlich 96, 100 und 102). Siehe auch WALLNER et al. 2004.

tet – niedrige Sequenzvariabilität am Y-Chromosom des Pferdes, auf Grund der bereits die Gründerhengste denselben Y-chromosomalen Haplotyp hatten, wird diskutiert.

3.2 Y-chromosomale Varianten beim domestizierten Pferd

Um die Y-chromosomale Sequenzvariabilität beim domestizierten Pferd zu prüfen, wurde der Datensatz dahingehend erweitert, dass 41 Tiere aus sehr distinkten Rassen in die Untersuchung miteinbezogen wurden. In diesem erweiterten Datensatz waren nun auch Tiere enthalten, die, wie der Araber, Andalusier und der Kladruber, aus den Gründerrassen des Lipizzaners stammten. Weiterhin wurden Vertreter von Rassen in die Untersuchungen mit aufgenommen, die aufgrund ihrer Zuchtgeschichte eine geringe Vermischung mit Tieren anderer Rassen erwarten ließen, wie das Englische Vollblut oder das Islandpferd. Für das Englische Vollblut existiert seit 1793 ein geschlossenes Zuchtbuch. Das Islandpferd hat insofern eine besondere Zuchtgeschichte, als in Island bereits im Jahr 930 nach Christus ein Einfuhrverbot für Pferde verhängt und der Bestand seit dieser Zeit in isolierter Reinzucht gehalten wird (SCHWARK 1988). Auch phänotypisch sehr unterschiedliche Tiere, wie Shetland-Ponys und Noriker, sowie Tiere aus geographisch sehr entfernten Zuchtgebieten (Achal Tekkiner aus Russland, Mongolisches Kleinpferd) wurden ebenfalls in die Untersuchung einbezogen. Die DNA-Proben der untersuchten Hengste stammten von Tieren, die sich noch im ursprünglichen Zuchtgebiet befanden.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen war überraschend eindeutig. Auf einer Gesamtlänge von 2638 bp wurden keine Sequenzunterschiede zwischen den Hengsten der untersuchten Rassen detektiert. Auch die Analyse der 6 Y-chromosomalen Mikrosatellitenmarker ergab bei allen 41 Hengsten unterschiedlichster Herkunft denselben Haplotyp. Daraus kann man schließen, dass auch die Begründer der Hengstlinien des Lipizzaners diesen Haplotyp hatten.

Das Pferd besitzt als einzige Haustierspezies die genetische Besonderheit, dass am Y-Chromosom bislang keine Variabilität gefunden wurde. Im Gegensatz dazu sind bei der zur Charakterisierung von mütterlichen Linien untersuchten mitochondrialen DNA sehr viele Varianten gefunden worden, und zwar sowohl beim Lipizzaner (KAVAR et al. 2004) als auch bei

anderen Rassen. (VILA et al. [2001] fanden 90 verschiedene mtDNA Haplotypen.) LINDGREN et al. (2004) überprüften die Beobachtungen von WALLNER et al. (2003) durch Sequenzierung von insgesamt 14 300 bp am Y-Chromosom des Pferdes bei 52 Pferden aus 15 verschiedenen Rassen. Auch diese Arbeitsgruppe konnte keine Polymorphismen am Y-Chromosom des Pferdes detektieren.

3.3 Hypothesen zur niedrigen Sequenzvariabilität am Y-Chromosom des Pferdes

Es wurde diskutiert, dass Selektion für die niedrige Sequenzvariabilität am Y-Chromosom des Pferdes verantwortlich sein könnte. Unter den bislang beschriebenen 32 Genen am Y-Chromosom des Pferdes befinden sich Gene, die für die Ausprägung eines funktionsfähigen männlichen Phänotyps verantwortlich sind. Aufgrund der fehlenden Rekombination verhält sich das gesamte Y-Chromosom wie eine einzige Kopplungsgruppe, sodass sich positive und negative Mutationen direkt und unmittelbar auswirken. Eine einzige vorteilhafte Basensubstitution an irgendeinem Genort kann unter Umständen zu einer Fixierung des gesamten Chromosoms führen („genetic hitchhiking“) – alle anderen Y-chromosomalen Varianten gehen dabei verloren (MAYNARD SMITH und HAIGH 1974). Obwohl es keine konkreten Publikationen gibt, die dieses Phänomen beim Pferd beschreiben, ist *genetic hitchhiking* als Ursache für die beobachtete niedrige Variabilität nicht auszuschließen.

Andererseits wird die beobachtete Variabilität an einem DNA-Abschnitt in der Population durch die Mutationsrate und die effektive Populationsgröße bestimmt (HARTL und CLARK 1989). Die effektive Populationsgröße des Y-Chromosoms korreliert direkt mit der Anzahl der männlichen Tiere, die zur Zucht eingesetzt werden. Für das ebenfalls haploide mitochondriale Genom, das maternal vererbt wird, gilt dieselbe Korrelation mit der Populationsgröße der weiblichen Tiere (HEDRICK 2000).

Die effektive Populationsgröße des Y-Chromosoms und der mitochondrialen DNA ist bei gleich vielen männlichen und weiblichen Individuen, die an der Reproduktion teilnehmen, gleich groß. Diese Annahme wird aber in der Realität nicht erreicht, weder unter natürlichen Verhältnissen noch in Populationen, die unter züchterischem Einfluss stehen. Dass die effektive Populationsgröße für Zuchthengste und Zuchtstuten nicht gleich groß ist, demonstrieren die Zahlen in den Stutbüchern. So stammen zum Beispiel 95 % der heute lebenden Englischen Vollblüter väterlicherseits vom Hengst Darley Arabian ab (CUNNINGHAM et al. 2001).

Das Phänomen eines monomorphen Y-Chromosoms, mit vergleichbar hoher mtDNA-Variabilität, passt somit zu dem starken Geschlechtsungleichgewicht in der Pferdezucht. Nur eine geringe Anzahl von Hengsten trug genetisch zum heutigen „domestizierten Pferd“ bei. Auch in modernen Züchtungsprogrammen werden vergleichsweise wenige Hengste für die Belegung vieler Stuten eingesetzt, was zu einer geringen Anzahl an väterlichen Linien führt.

Die Polygynie in der Pferdezucht allein kann jedoch nicht zum gänzlichen Verlust Y-chromosomaler Variabilität führen. Es müssten zumindest Unterschiede zwischen den Rassen gefunden werden. Sowohl LINDGREN et al. 2001, als auch LAU et al. 2009 stellen die Behauptung auf, dass bereits in den Anfängen der Domestikation, als Pferde ein wichtiges Nahrungsmittel waren, ein starkes Reproduktionsungleichgewicht bestand. Mit Stuten wurde gezüchtet, die meisten Hengste fielen bereits vor der Teilnahme an der Reproduktion der Nahrungsgewinnung anheim. Als dann Haustiere (und die Kenntnisse der Tierhaltung) von einer Sippe an die nächste weitergegeben wurden, könnte das durch Austausch von domestizierten Hengsten passiert sein, während bei den Stuten wildlebende autochthone Tiere hinzugefan-

gen wurden. Folglich war die Variabilität am Y-Chromosom möglicherweise schon reduziert, als vor etwa 6000 Jahren wilde Pferde domestiziert worden sind.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die bislang festgestellte Konstanz am Y-Chromosom und die beobachtete Variabilität der mitochondrialen DNA beim Pferd das Ergebnis der lange praktizierten Zuchtstrategie sind, und dass die Auslöser für die unterschiedliche Verteilung von mütterlichen und väterlichen Haplotypen bereits seit der Domestikation gewirkt haben. Eine wirklich schlüssige Erklärung für die festgestellte Monomorphie am Y-Chromosom des Pferdes gibt es bislang nicht.

Literatur

- CUNNINGHAM, E., DOOLEY, J., SPLAN, R., and BRADLEY, D.: Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Anim. Genet.* 32, 360–364 (2001)
- GOLDSTEIN, D., and SCHLÖTTERER, C.: *Microsatellites. Evolution and Applications.* Oxford: Oxford University Press 1999
- GREGORY, S., SEKHOM, M., SCHEIN, J., et al.: A physical map of the mouse genome. *Nature* 418, 743–750 (2002)
- FOSTER, E., JOBLING, M. A., TAYLOR, P. G., DONNELLY, P., KNIJFF, P. D., MIEREMET, R., ZERJAL, T., and TYLER-SMITH, C.: Jefferson fathered slave's last child. *Nature* 396, 27–28 (1998)
- HARTL, D., and CLARK, A.: *Principles of Population Genetics.* 2nd ed. Sunderland (UK): Sinauer Associates 1989
- HEDRICK, P.: *Genetics of Populations.* 2nd ed. London (UK): Jones and Bartlett Publishers, Inc. 2000
- HEYER, E., PUYMIRAT, J., DIELTJES, P., BAKKER, E., and KNIJFF, P.: Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Hum. Mol. Genet.* 6, 799–803 (1997)
- HILL, E., JOBLING, M., and BRADLEY, D.: Y-chromosome variation and Irish origins. *Nature* 404, 351–352 (2000)
- HUGHES, J., SKATELSKY, H., PYNTIKOVA, T., GRAVES, T., VAN DAALLEN, S., MINX, P., FULTON, R., MCGRATH, S., LOCKE, D., FRIEDMAN, C., TRASK, B., MARDIS, E., WARREN, W., REPPING, S., ROZEN, S., WILSON, R., and PAGE, D.: Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. *Nature* 463, 536–539 (2010)
- KANTANEN, J., EDWARDS, C., BRADLEY, D., VIINALASS, H., THESSLER, S., IVANOVA, Z., KISELYOVA, T., CINKULOV, M., POPOV, R., STOJANOVIC, S., AMOSOV, I., and VILKKI, J.: Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity* 103, 404–415 (2009)
- KAVAR, T., BREM, G., HABE, F., SÖLKNER, J., and DOVC, P.: History of Lipizzan maternal lines as revealed by mtDNA analysis. *Genet. Sel. Evol.* 34, 635–648 (2002)
- KAYSER, M., ROEWER, L., HEDMAN, M., HENKE, L., BRAUER, S., KRUGER, C., KRAWCZAK, M., NAGY, M., DOBOSZ, T., SZIBOR, R., KNIJFF, P. D., STOKENING, M., and SAJANTILA, A.: Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Amer. J. Hum. Genet.* 66, 1580–1585 (2000)
- KING, T., and JOBLING, M.: What's in a name? Y chromosomes, surnames and the genetic genealogy revolution. *Trends Genet.* 25, 351–360 (2009)
- KING, J., and JUKES, T.: Non-Darwinian evolution. *Science* 164, 788–798 (1969)
- LAU, A. N., PENG, L., GOTO, H., CHEMNICK, L., RYDER, O. A., and MAKOVA, K. D.: Horse domestication and conservation genetics of Przewalski's horse inferred from sex chromosomal and autosomal sequences. *Molecular Biology and Evolution* 26/1, 199–208 (2009)
- LEHRNER, H.: *Lippizaner heute: 400 Jahre Gestütszucht.* 2. Aufl. Frankfurt (Main): Limpert 1982
- LINDGREN, G., BACKSTRÖM, N., SWINBURNE, J., HELLBORG, L., EINARSSON, A., SANDBERG, K., COTHAN, G., VILA, C., BINNS, M., and ELLEGREN, H.: Limited number of patrilineal lines in horse domestication. *Nature Genet.* 36, 335–336 (2004)
- MAYNARD SMITH, J., and HAIGH, J.: The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet. Res.* 23, 25–35 (1974)
- MEADOWS, J., HANOTTE, O., DRÖGEMÜLLER, C., CALVO, J., GODFREY, R., COLTMAN, D., and KIJAS, J. W.: Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep. *Anim. Genetics* 37, 444–453 (2006)
- QUILTER, C. R., BLOTT, S. C., MILEHAM, A. J., AFFARA, N. A., SARGENT, C. A., and GRIFFIN, D. K.: A mapping and evolutionary study of porcine sex chromosome genes. *Mamm. Genome* 13/10, 588–594 (2002)

- RAMIREZ, O., OJEDA, A., TOMAS, A., GALLARDO, D., HUANG, L., FOLCH, J., CLOP, A., SANCHEZ, A., BADAOU, B., HANOTTE, O., GALMAN-OMITOGUN, O., MAKUZA, S., SOTO, H., CADILLO, J., KELLY, L., CHO, I., YEGHYAN, S., PEREZ-ENCISO, M., and AMILLS, M.: Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. *Mol. Biol. Evol.* 26, 2061–2072 (2009)
- RAUDSEPP, T., and CHOWDHARY, B.: The horse pseudoautosomal region (PAR): characterization and comparison with the human, chimp and mouse PARs. *Cytogenet. Genome Res.* 12, 102–109 (2008)
- RAUDSEPP, T., SANTANI, A., WALLNER, B., KATA, S., REN, C., ZHANG, H., WOMACK, J. E., SKOW, L. C., and CHOWDHARY, B. P.: A detailed physical map of the horse Y chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9321–9326 (2004)
- RICE, W.: Evolution of the Y sex chromosome in animals. *BioScience* 46, 331–343 (1996)
- ROEWER, L., KAYSER, M., DIELTJES, P., NAGY, M., BAKKER, E., KRAWCACK, M., and KNIJFF, P.: Analysis of molecular variance (AMOVA) of Y-chromosome-specific microsatellites in two closely related human populations. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1029–1033 (1996)
- ROHOZINSKI, J., AGOULNIK, A. I., BOETTGER-TONG, H. L., and BISHOP, C. E.: Successful targeting of mouse V chromosome genes using a site-directed insertion vector. *Genesis* 32/1, 1–7 (2002)
- SKATELSKY, H., KURODA-KAWAGUCHI, T., MINX, P., CORDUM, H., HILLIER, L., BROWN, L. G., REPPING, S., PYNTIKOVA, T., ALI, J., BIERI, T., CHINWALLA, A., DELEHAUNTY, A., DELEHAUNTY, K., DU, H., FEWELL, G., FULTON, L., FULTON, R., GRAVES, T., HOU, S. F., LATRIELLE, P., LEONARD, S., MARDIS, E., MAUPIN, R., MCPHERSON, J., MINER, T., NASH, W., NGUYEN, C., OZERSKY, P., PEPIN, K., ROCK, S., ROHLFING, T., SCOTT, K., SCHULTZ, B., STRONG, C., TIN-WOLLAM, A., YANG, S. P., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., ROZEN, S., and PAGE, D. C.: The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423, 825–837 (2003)
- SKORECKI, K., SELIG, S., BLAZER, S., BRADMAN, R., BRADMAN, N., WARBURTON, P., and HAMMER, M.: Y chromosomes of Jewish priests. *Nature* 385, 32 (1997)
- SCHWARK, H.: *Pferdezucht*. 3. Aufl. München: BVL Verlagsgesellschaft 1988
- SUNDQVIST, A., BJÖRNERFELDT, S., LEONARD, J., HAILER, F., HEDHAMMAR, A., ELLEGREN, H., and VILA, C.: Unequal contribution of sexes in the origin of dog breeds. *Genetics* 172, 1121–1128 (2006)
- SUTOVSKY, P., MORENO, R. D., RAMALHO-SANTOS, J., DOMINKO, T., SIMERLY, C., and SCHATTEIN, G.: Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, 371–372 (1999)
- VILA, C., LEONARD, J., GÖTHERSTRÖM, A., MARKLUND, S., SANDBERG, K., LIDEN, K., WAYNE, R., and ELLEGREN, H.: Widespread Origins of Domestic Horse Lineages. *Science* 291, 474–477 (2001)
- WALLNER, B.: *Selektive Klonierung von Y-chromosomalen DNA-Sequenzen mittels „Representational Difference Analysis“*. Dissertation, Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Wien 2001
- WALLNER, B., BREM, G., MÜLLER, M., and ACHMANN, R.: Fixed nucleotide differences on the Y chromosome indicate clear divergence between *Equus przewalskii* and *Equus caballus*. *Anim. Genet.* 34, 453–456 (2003)
- WALLNER, B., PIUMI, F., BREM, G., MÜLLER, M., and ACHMANN, R.: Isolation of Y chromosome-specific microsatellites in the horse and cross-species amplification in the genus *Equus*. *J. Hered.* 95, 158–164 (2004)
- XUE, Y., WANG, Q., LONG, Q., NG, B. L., SWERDLOW, H., BURTON, J., SKUCE, C., TAYLOR, R., ABDELLAH, Z., ZHAO, Y., ASAN, MACARTHUR, D. G., QUAIL, M. A., CARTER, N. P., YANG, H., and TYLER-SMITH, C.: Human Y chromosome base-substitution mutation rate measured by direct sequencing in a deep-rooting pedigree. *Curr. Biol.* 15, 1453–1457 (2009)

Dr. Barbara WALLNER
Institut für Tierzucht und Genetik
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250775627
Fax: +43 1 250775690
E-Mail: barbara.wallner@vetmeduni.ac.at

Der Begriff der Natur

Wandlungen unseres Naturverständnisses und seine Folgen

Gaterslebener Begegnung 2009

gemeinsam veranstaltet

vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben und
von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina
vom 7 bis 9. Mai 2009

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 109, Nr. 376

Herausgegeben von Anna M. WOBUS (Gatersleben), Ulrich WOBUS (Gatersleben)
und Benno PARTHIER (Halle/Saale)

(2010, 266 Seiten, 50 Abbildungen, 1 Tabelle, 29,95 Euro, ISBN 978-3-8047-2801-1)

Das Verhältnis des Menschen zur „Natur“ ist in seiner Geschichte durch unterschiedliche Beziehungen geprägt. Seit der Aufklärung wird die Natur dem Menschen zu seiner Nutzung untergeordnet und zunehmend ausgebeutet. Natur wurde zum Objekt technischen, ökonomischen und politischen Handelns. Spätestens seit Mitte des vorigen Jahrhunderts wissen wir um die akute Gefährdung natürlicher Lebensräume.

Die Gaterslebener Begegnung 2009 widmete sich daher dem Thema „Der Begriff der Natur“ und untersuchte Wandlungen des Naturverständnisses sowie die Folgen der gegenwärtigen Auffassungen von Natur. Behandelt werden unser Bild vom Leben, die Frage „Was ist Natur?“ aus verschiedenen Perspektiven und die philosophische Analyse der Stellung des Menschen in der Natur. Beiträge zum Naturverständnis in der Gegenwartskunst und zum Problemkomplex Naturrecht und Bioethik sowie eine Diskussion „Frieden mit der Natur“ ergänzen den Band.

Das mitochondriale Genom

Jörg BURGSTALLER und Gottfried BREM ML, kMÖAW (Wien)

Mit 3 Abbildungen

Zusammenfassung

Die mitochondriale DNA (mtDNA) ist ein ringförmiges Molekül von 17 kb Länge, das an der inneren Membran des Mitochondriums lokalisiert ist. Je nach Zelltyp liegt die mtDNA in einigen hundert bis einigen tausend Kopien in somatischen Zellen und bis zu einigen hunderttausend Kopien in Eizellen vor. Die mtDNA codiert für 13 Schlüsselproteine der Atmungskette sowie für eigene ribosomale RNAs und transfer RNAs.

Seit ihrer Entdeckung (1963) wird sie durch ihre beim Säugetier rein matrikline Vererbung für Abstammungsanalysen in der Mutterlinie genutzt, wurde als Ursache für Erbkrankheiten erkannt und wird, da sie im Zentrum der Atmungskette steht, mit Leistungsfaktoren und dem Alterungsprozess in Zusammenhang gebracht.

Mutationen der mtDNA in der Keimbahn können gravierende Auswirkungen haben. Sie spielen in der Humanmedizin mit einer Erkrankungshäufigkeit von 1 in 400 bis 8000 (je nach Studie) eine große Rolle. Meist liegt in der Zelle eine Mischung aus Wildtyp und mutierter mtDNA vor, ein Zustand der Heteroplasmie genannt wird. Tiermodelle, in denen solch eine Heteroplasmie künstlich hergestellt wird, dienen als Grundlage für die Erforschung der komplexen Vorgänge, die Vererbung und Verlauf mitochondrialer Erkrankungen bestimmen.

Abstract

The mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular molecule of 17 kb length, located at the inner membrane of the mitochondrion. A somatic cell contains several hundred to several thousand copies of mtDNA, depending on the cell type, and an oocyte up to several hundred thousand. The mtDNA codes for 13 key proteins of the respiratory chain and for its own ribosomal RNAs and transfer RNAs.

Since its discovery in 1963 mtDNA is used for ancestry analysis due to its strictly maternal inheritance in mammals, has been recognised as cause of several hereditary diseases and, being a key factor of the respiratory chain, is discussed as a cofactor of the aging process and of yield traits in livestock breeding.

In the germ line, mutations of the mtDNA can have dramatic effects. In humans, a mitochondrial disease affects, depending on the study, one in 400 to 8000 individuals. In most cases both wild type and mutated mtDNA are present, a situation called heteroplasmy. Such a heteroplasmy can be created artificially in animal models. These models are the basis for the study of the complex patterns of the inheritance and course of mitochondrial diseases.

1. Die mitochondriale DNA

Neben der nukleären chromosomalen DNA besitzt jede höhere eukaryotische Zelle in den Mitochondrien auch mitochondriale DNA (mtDNA). Die mtDNA der Säugetiere ist ein ringförmiges Molekül von 17 kb Länge. Sie kodiert für 13 Schlüsselproteine der Atmungskette und die ribosomalen (r)RNAs und Transfer (t)RNAs, die für die Translation der korrespondierenden Messenger (m)RNAs notwendig sind (SHOUBRIDGE 2000). Je nach Zelltyp liegt sie in somatischen Zellen in einigen hundert bis einigen tausend Kopien vor. Oozyten enthalten bis

zu einigen 100 000 Kopien (WAI et al. 2010). Die mtDNA ist in der mitochondrialen Matrix fixiert, wo sie in sogenannten Nukleoiden an der inneren Membran befestigt ist und durch spezielle Proteine dicht gepackt und vor Sauerstoffradikalen geschützt wird. In den Nukleoiden befinden sich je nach Zelltyp (und Untersuchungsmethode) bis ca. 10 mtDNAs (GILKERSON 2009), wobei Oozyten und Spermien möglicherweise nur eine mtDNA pro Nukleoid besitzen (WAI et al. 2008, WHITE et al. 2008). Nukleoiden kommt eine wichtige Rolle während der Teilung und Fusion von Mitochondrien zu, da sich in jedem neu gebildeten Teil eines Mitochondriums mindestens ein Nukleoid befinden muss. Ob mtDNAs zwischen Nukleoiden wechseln können, bzw. ob auch Nukleole wie die Mitochondrienmembran verschmelzen können, ist noch nicht geklärt (IBORRA et al. 2004, GILKERSON et al. 2008).

Die mtDNA wird bei Säugetieren rein maternal vererbt. Die Mitochondrien der Spermien, die sich im Spermienmittelstück befinden, werden durch ein Ubiquitin-gesteuertes System nach der Befruchtung abgebaut (SUTOVSKY et al. 1999, 2000). Allerdings scheint – vor allem bei Interspezies-Kreuzungen – mitunter eine Vererbung paternaler mtDNA möglich zu sein (GYLLENSTEN et al. 1991), und ein Fall paternaler Vererbung von mtDNA ist auch beim Menschen beschrieben (SCHWARTZ und VISSING 2002).

2. Mutationsrate

Im Vergleich zur nukleären DNA hat die mtDNA eine etwa zehnmal höhere Mutationsrate (HAAG-LIAUTARD et al. 2008). Die Gründe hierfür sind vermutlich die hohe Konzentration von mutagenen Sauerstoffradikalen, die in der Atmungskette entstehen, und ein im Vergleich zum Kern weniger effizientes DNA-Reparatursystem. Darüber hinaus führt die, vom Zellzyklus unabhängige, Replikation der mtDNA zu einer erhöhten Replikationsrate und in Summe zu einer ebenfalls erhöhten Anzahl von Mutationen. Aus der hohen Mutationsrate resultiert eine hohe Variabilität der mtDNA innerhalb einer Spezies. Interessanterweise schwankt die Mutationsrate aber stark zwischen den Spezies: Spezies mit einer höheren Lebenserwartung zeigen eine geringere Mutationsrate (NABHOLZ et al. 2008). Allgemein werden Mutationen der mtDNA und damit eine verminderte respiratorische Kapazität der Zelle mit dem Alterungsprozess in Zusammenhang gebracht (GALTIER et al. 2009).

Dies konnte deutlich anhand eines Tiermodells gezeigt werden. Es wurden Mäuse generiert („mutator mouse“), die durch eine veränderte mitochondriale Polymerase eine extrem hohe Mutationsrate der mtDNA aufweisen (TRIFUNOVIC et al. 2004). Tatsächlich zeigen diese Mäuse einen Phänotyp, der einer vorzeitigen Alterung entspricht. Die Mäuse zeigten Gewichtsverlust, eine Reduktion des subkutanen Fettgewebes, Haarausfall, Herzvergrößerung, Anämie, Osteoporose und eine reduzierte Fertilität. Die durchschnittliche Lebenserwartung sank auf 48 Wochen.

Ob tatsächlich die Summe einzelner Mutationen oder eher größere Deletionen der mtDNA für diesen Phänotyp verantwortlich sind, ist nun Gegenstand aktueller Diskussion (EDGAR und TRIFUNOVIC 2009).

Durch Rückkreuzung dieser Mäuse mit Wildtypmäusen konnten eine Reihe von Linien mit normaler mitochondrialer Polymerase, aber im Schnitt 20 Mutationen in der mtDNA gegenüber der Wildtyp-mtDNA gezüchtet werden. Eine genaue Analyse dieser Mutationen zeigte, dass Mutationen in der Kontrollregion, den tRNAs und rRNAs und synonyme Mutationen der proteinkodierenden Regionen gleich häufig in Oozyten dieser Mäuse vorkommen, während nicht-synonyme Mutationen mit einer signifikant geringeren Häufigkeit auftreten.

Offensichtlich gibt es in der Keimbahn einen Filter für stark schädliche Mutationen in der proteinkodierenden Region der mtDNA (STEWART et al. 2008). Dieser Filter scheint in normalem Gewebe zu funktionieren, nicht jedoch in Tumoren (HE et al. 2010).

3. Funktionelle Unterschiede und Adaptation

Die Frage, ob unterschiedliche Typen mitochondrialer DNA innerhalb einer Spezies zu funktionellen Unterschieden in der Atmungskette führen können oder etwa über unterschiedliche Leistung oder Wärmeproduktion unter einem evolutionären Druck stehen, wird sehr kontrovers diskutiert (DA FONSECA et al. 2008). Offenbar wirkt die oben erwähnte Selektion in der Keimbahn der Maus gegen Mutationen, die ein mtDNA-kodiertes Protein stark funktionell verändern, lässt aber ein gewisses Maß an Schwankung zu (FAN et al. 2008). Weiterhin scheint sie viel schwächer auf die rRNA und tRNA zu wirken. Dies könnte auch beim Menschen der Fall sein, da 60 % aller mtDNA-basierenden Erkrankungen von Mutationen der tRNAs ausgelöst werden, die in Summe aber nur von ca. 9 % der Sequenz der mtDNA codiert werden (STEWART et al. 2008).

Wenn diese Situation bei allen Säugetieren ähnlich ist, könnte man also leichte Unterschiede in der Funktion der Proteine, und stärkere Unterschiede in der Kontrollregion, die die Replikation und Transkription reguliert, sowie der Funktion der rRNAs und tRNAs erwarten.

Allerdings sind diese Unterschiede experimentell schwer nachzuweisen, da sie von der Zelle bis zu einem gewissen Grad kompensiert werden können. Dies konnte an transmittochondrialen Mauszelllinien gezeigt werden, die bei gleichem Kerngenom unterschiedliche mtDNAs besitzen. Die unterschiedliche mtDNA führt in einigen Fällen zu einer höheren Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) und einer geringeren respiratorischen Kapazität der Zelle, bezogen auf die einzelne mtDNA. Interessanterweise wird dieser Nachteil durch eine Erhöhung der Anzahl der mtDNAs pro Zelle und damit der mitochondrialen Biogenese ausgeglichen, so dass die Zellatmung unverändert erscheint (MORENO-LOSHUERTOS et al. 2006).

Trotz dieser Schwierigkeit konnte gezeigt werden, dass einige Leistungsmerkmale von Nutztieren teilweise von ihrer mtDNA mitbestimmt werden. Beim Rind wurde ein Zusammenhang zwischen mtDNA-Typ und Fertilität (SUTARNO et al. 2002), Milchleistung (BOETTCHER et al. 1996) und Wachstum (ZHANG et al. 2008) gefunden. Beim Pferd wird von einer speziellen Adaptation der mtDNA an Lebensräume in Höhen über 2200 m berichtet (NING et al. 2010). Da durch die maternale Vererbung der mtDNA ihre Variabilität nicht durch die künstliche Besamung vermindert wurde, wäre es interessant, den Einfluss dieser Variabilität auf die Leistung von Nutztieren zu untersuchen. Die rasante Entwicklung der Sequenzierungstechnik macht es heute möglich, die gesamte mtDNA sehr leicht und kostengünstig zu erfassen. Deshalb ist zu erwarten, dass sich dieses Forschungsgebiet sehr schnell entwickeln wird.

4. Mitochondriale Erkrankungen

Erkrankungen, die auf Mutationen in der mtDNA zurückzuführen sind, spielen in der Humanmedizin eine große Rolle. Sie betreffen im Durchschnitt einen von 5000 Menschen. Pathogene Allele findet man in ca. einem von 200 Neugeborenen, und in einem von 1000 Neu-

geborenen entsteht eine pathologische Mutation *de novo* (CREE et al. 2009). Durch die oben erwähnte maternale Vererbung der mtDNA besitzt jede Zelle nur einen mtDNA-Typ. Dieser Zustand wird als Homoplasmie bezeichnet. Kommt es durch Mutationen zu einer Mischung aus Wildtyp und mutierter mtDNA, spricht man von Heteroplasmie.

Meist kommt es erst ab einem Schwellenwert von ca. 60–90 % mutierter mtDNA in der Zelle zum Ausbruch der Erkrankung, da die negativen Auswirkungen der mutierten mtDNAs von den Wildtyp-mtDNAs kompensiert werden können (ROSSIGNOL et al. 2003). Allerdings ist auch ein Fall von einer dominanten mtDNA-Mutation mit einem Schwellenwert von nur ca. 4 % mutierter mtDNA bekannt (SACCONI et al. 2008). Das klinische Bild dieser Erkrankungen variiert abhängig von der Mutation und dem Grad der Heteroplasmie in den Geweben sehr stark. Durch die Störung der Atmungskette sind meist jene Organe, die einen erhöhten Energiebedarf aufweisen, wie das zentrale und periphere Nervensystem und die Muskulatur (WALLACE 1999, HOLMGREN et al. 2003), am stärksten betroffen. Umweltfaktoren, aber auch genetische Faktoren aus dem Kerngenom können die Erkrankung wesentlich beeinflussen. Dadurch ist es oft sehr schwierig und langwierig, mitochondriale Erkrankungen einzelnen Mutationen zuzuordnen.

Bei Haustieren werden mitochondriale Erkrankungen selten diagnostiziert, doch es ist zu erwarten, dass mit der zunehmenden Verfügbarkeit von molekularbiologischen Screeningmethoden in der Veterinärmedizin die Anzahl der bekannten Fälle steigen wird.

Ein Beispiel für den relativen großen Aufwand zum Nachweis einer mitochondrialen Erkrankung ist die kürzlich beim Golden Retriever aufgeklärte Sensorische Ataktische Neuropathie (JADERLUND et al. 2007). Betroffene Tiere zeigen im Alter von 2 bis 8 Monaten Ataxien und verminderte spinale Reflexe. Histopathologisch wurden Läsionen im zentralen und peripheren Nervensystem gefunden. Eine Analyse des Stammbaums von über 270 Tieren zeigte eine rein maternale Vererbung. Durch eine Sequenzanalyse der gesamten mtDNA von gesunden und erkrankten Tieren wurde schließlich eine Mutation in einem Gen, das für die mitochondriale Transfer-RNA für Tyrosin codiert, gefunden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass ca. 90 % der mtDNAs im Blut von erkrankten Tieren diese Mutation trugen. Allerdings erreichten teilweise auch verwandte gesunde Tiere einen ähnlich hohen Wert. Schließlich konnte gezeigt werden, dass erkrankte im Unterschied zu nicht erkrankten Tieren in den betroffenen Organen fast nur noch mutierte mtDNA besitzen und die Mutation für diese Erkrankung kausal ist (BARANOWSKA et al. 2009).

5. mtDNA als Biomarker in der Tumordiagnostik

Die mtDNA könnte zukünftig auch in der Tumordiagnostik eine Rolle spielen. In Tumorzellen ist die mtDNA häufig und schon in frühen Stadien mutiert. Da Tumorgewebe aus einer Einzelzelle klonal entsteht, besitzen meist alle Zellen mitochondriale Mutationen, die sie vom gesunden Gewebe unterscheiden. Da mtDNA ca. 500 bis 1000-mal pro Zelle vorkommt und deshalb leichter zu detektieren ist als nukleäre DNA, ist die mtDNA ein idealer Biomarker. So konnte gezeigt werden, dass tumorspezifische mtDNA in nur 25 µl Plasma sicher gefunden werden konnte, im Gegensatz zu 2 ml, die für nukleäre Tumormarker gebraucht werden (HE et al. 2010). Durch die Messung der Menge von zirkulierender mtDNA aus Tumorzellen kann die Wirksamkeit einer Therapie sehr schnell abgeschätzt werden (DIEHL et al. 2008).

6. Der mitochondriale „Flaschenhals“

Eine der zentralen Fragen der mitochondrialen Genetik ist, warum trotz der hohen Mutationsrate der mtDNA in der Keimbahn meist Homoplasmie herrscht. Einerseits ist bekannt, dass sowohl in der Keimbahn (ASHLEY et al. 1989, HE et al. 2010) als auch im Gewebe (IRWIN et al. 2009, HE et al. 2010) regelmäßig Heteroplasmie auftritt. Andererseits besitzt der Organismus einen wichtigen Mechanismus, der es ihm ermöglicht, eine auftretende Heteroplasmie in der Keimbahn (durch Mutation oder paternale Vererbung) innerhalb der nächsten Generationen wieder zu korrigieren, den sogenannten mitochondrialen Flaschenhals (*bottleneck*). Er wurde erstmals 1982 bei Holstein-Kühen beschrieben, wo die Nachkommen einer heteroplasmatischen Kuh innerhalb von nur ein bis zwei Generationen jeweils den einen oder anderen Typ von mtDNA (Mitotyp) homoplasmatisch zeigten (HAUSWIRTH und LAIPIS 1982, ASHLEY et al. 1989).

Um die Auswirkung und die Vererbung der mtDNA-Heteroplasmie genauer zu erforschen, wurden verschiedene Tiermodelle genutzt. Wichtige Beiträge für das Verständnis über die Funktion des Bottlenecks haben heteroplasmatische Mäuse gebracht, die durch Fusion eines Karyoplasten mit einer Blastomere von zwei verschiedenen Labormausstämmen (NZB/BlJ und BALB/cByJ) erzeugt wurden. Durch die Analyse der Schwankungsbreite der Heteroplasmiengrade der Nachkommen in Relation zur Heteroplasmie des Muttertieres konnte mittels populationsgenetischer Methoden die „Weite“ des Flaschenhalses, die diese Verteilung erklären kann, berechnet werden (Abb. 1). Im Schnitt scheinen bei der Maus ca. 200 „Segregierende Einheiten“ der primordialen Keimzellen, also entweder mtDNAs oder gesamte Nukleotide, als Basis für die ca. 200 000 mtDNAs der reifen Oozyte verwendet zu werden (JENUTH et al. 1996). Durch diese geringe Anzahl der mtDNAs, die an die nächste Generation weitergegeben werden, erhöht sich einerseits die Chance, dass alle vom gleichen Typ sind, andererseits kann es dabei aber auch zu sehr großen Änderungen des Verhältnisses zweier verschiedener mtDNAs bei Heteroplasmie kommen. Wie und zu welchem Zeitpunkt die Auswahl dieser Subpopulation erfolgt und ob sie zufällig ist, ist noch ungeklärt (CREE et al. 2009).

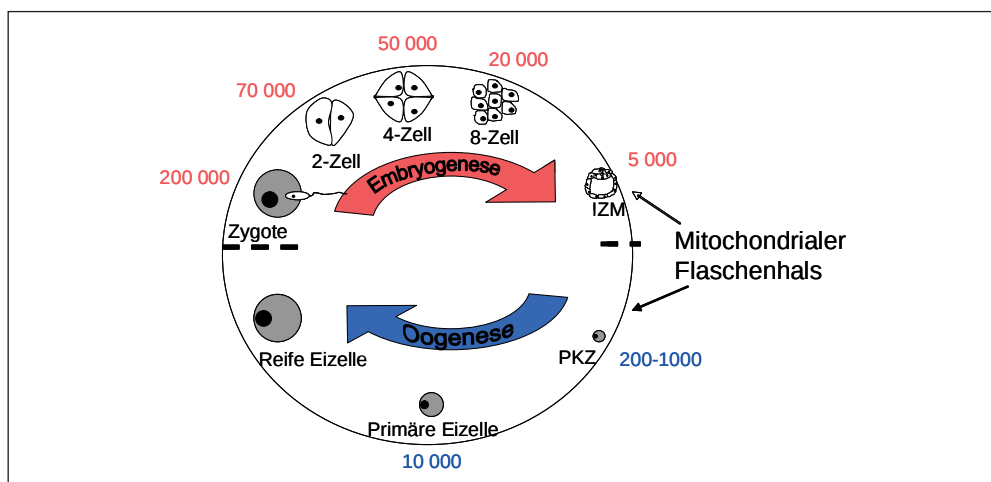


Abb. 1 Der mitochondriale Flaschenhals. IZM, Innere Zellmasse; PKZ, Primordiale Keimzelle (modifiziert nach WAI et al. 2008, WHITE et al. 2008)

7. Unterschiede in der Replikation zwischen mtDNAs?

Interessanterweise wurde auch festgestellt, dass die Verteilung der verwendeten Mitotypen in dem oben erwähnten Fall nicht neutral ist, sondern in Leber und Milz/Blut jeweils einer der Mitotypen bevorzugt angereichert wird (JENUTH et al. 1997). Ein ähnliches Phänomen wurde bei heteroplasmatischen Mäusen zwischen den Unterarten *Mus musculus domesticus* und *Mus musculus musculus* beobachtet. Kernunabhängig setzt sich im Blut jeweils der *M. musculus musculus*-Mitotyp durch (TAKEDA et al. 2000).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit geklonten Tieren erzielt, die je nach Methode des Klonens einen gewissen Anteil des Zytoplasmas und dadurch auch der mtDNA des Kernspenders enthalten. Untersucht wurden in den letzten Jahren eine große Anzahl von Rindern (STEINBORN et al. 1998, HIENDLEDER et al. 1999, TAKEDA et al. 1999, STEINBORN et al. 2000, MEIRELLES et al. 2001, STEINBORN et al. 2002, HIENDLEDER et al. 2003, TAKEDA et al. 2003, FERREIRA et al. 2007, TAKEDA et al. 2008), aber auch Mäuse (INOUE et al. 2004), Schweine (TAKEDA et al. 2006) und Schafe (BURGSTALLER et al. 2007). In den meisten Fällen scheint sich die mtDNA-Heteroplasmie neutral zu verhalten, d. h., die verwendeten Mitotypen zeigten im geklonten Tier ein ähnliches Verhältnis zueinander, wie es das Verhältnis der Menge des beim Klonen gemischten Zytoplasmas erwarten lassen würde. Allerdings gibt es bei jeder der verwendeten Tierarten Ausnahmen hiervon: Bei geklonten Rindern wurde in mehreren Fällen eine unerwartet hohe Heteroplasmie nachgewiesen (HIENDLEDER et al. 1999, TAKEDA et al. 2003), beim Schaf in einem Fall (BURGSTALLER et al. 2007), und beim Schwein wurde eine gewebsspezifische Anreicherung der Donor-mtDNA in der Leber festgestellt (TAKEDA et al. 2006). Da in den meisten Fällen die mtDNA nicht sequenziert wurde und die Anzahl der untersuchten Tiere relativ klein ist, bleibt unklar, ob diese Ausnahmen zufällig sind oder ob funktionelle Mechanismen die Ursache sind, die sowohl in der mtDNA, dem Kerngenom oder der Klonierungsmethode begründet sein können.

8. Tiermodelle zum Ooplasmatransfer / Eigene experimentelle Ansätze

Tiermodelle sind auch wichtig, um die Auswirkungen von humanmedizinisch relevanten assistierten reproduktionsmedizinischen Techniken zu überprüfen, bei denen es zum Austausch von Zytoplasma und damit auch der mtDNA kommt. Beim Menschen wurden 5–15 % des Ooplasmas einer fertilen Oozyte in eine nicht-fertile übertragen, um damit die Entwicklung eines Embryos möglich zu machen. Tatsächlich zeigte diese Methode Erfolg (BARRITT et al. 2001), wenn auch um den Preis einer mitochondrialen Heteroplasmie in den so erzeugten Nachkommen. Die Frage nach einer potentiellen Schädlichkeit dieser Heteroplasmie wurde kontrovers diskutiert (BARRITT et al. 2001, SILLS et al. 2004, BREDENOORD et al. 2008). Eine ähnliche Methode, der Karyoplast-Transfer, wurde auch verwendet, um heteroplasmatische Mausmodelle für die Erforschung der Transmission und Segregation von mtDNA herzustellen (JENUTH et al. 1996, MEIRELLES und SMITH 1997). Dabei wird ein Teil einer entkernten Oozyte (Karyoplast) mit einer Rezipienten-Oozyte verschmolzen, wobei eine ähnliche Übertragung von 7–19 % Donor-Ooplasma wie beim Menschen erreicht wurde. Dabei zeigte sich, dass es teilweise nicht nur, wie oben beschrieben, zu einer gewebsspezifischen Anreicherung bestimmter mtDNA-Typen kam, sondern dass es auch zu starken physiologischen Veränderungen der heteroplasmatischen Mäuse kommen

kann (ACTON et al. 2007). Die Tiere zeigten u. a. Bluthochdruck, Gewichtszunahme und Veränderungen im Blutbild.

Um ein Tiermodell zu schaffen, das dem Menschen bezüglich Lebenserwartung und Metabolismus näher steht als die Maus, haben wir vor kurzem das Rind als Modell eingeführt (FERREIRA et al. 2010). Möglicherweise können dadurch auch Langzeitfolgen der mtDNA-Heteroplasmie besser abgeklärt werden als mit der relativ kurzlebigen Maus. Unser Modell basiert auf den beiden Unterarten des Rindes *Bos primigenius taurus* und *Bos primigenius indicus*. Diese beiden Unterarten sind uneingeschränkt miteinander verpaarbar, ihre mtDNAs unterscheiden sich aber in 237 Positionen voneinander (HIENDLEDER et al. 2008), wodurch der Nachweis der Heteroplasmie erleichtert wird. Optimal geeignet sind dazu Nellore-Rinder, eine Rasse, die in Brasilien durch Kreuzung von Zebus mit den von den Spaniern importierten taurinen Rindern entstanden ist. Je nach Mutterlinie besitzen sie dadurch entweder *B. primigenius taurus* (häufiger) oder *B. primigenius indicus* (nur reinrassige Tiere) mtDNA (FERREIRA et al. 2007, GIBBS et al. 2009). Einerseits wurden mittels „klassischem“ Ooplasmatransfer ca. 15 % des Ooplasmas einer *B. primigenius indicus*-Oozyte in eine *B. primigenius taurus*-Oozyte übertragen, und andererseits wurde versucht, diesen Anteil noch weiter zu erhöhen.

Der Ooplasmatransfer könnte auch therapeutisch verwendet werden, um pathologisch veränderte mtDNA in der Oozyte genügend zu verdünnen, um den Anteil der pathologischen mtDNA in den Nachkommen unter dem Schwellenwert zu halten und einen Ausbruch einer Erkrankung zu verhindern. Dafür wäre aber eine Übertragung von mindestens 50 % der mtDNA nötig (BREDENOORD et al. 2008).

Um dies zu erreichen, kann man die Oozyte vor dem Ooplasmatransfer zentrifugieren. Dadurch lagert sich die mitochondrienhaltige Fraktion an einem Pol an (Abb. 2). Diese Fraktion wird dann abgesaugt und durch normales Ooplasma einer Donorzelle ersetzt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass dabei wie beim „klassischen“ Ooplasmatransfer nur ca. 15 % des Gesamtvolumens der Oozyte verändert werden, dabei aber wie in unserem Fall 25 % der mtDNA ausgetauscht werden. Da in der abgesaugten Ooplasmafraktion die Mitochondrien konzentriert sind, sie aber nur mit dem gleichen Volumen nicht-konzentrierten Ooplasmas ersetzt wurden, kommt es in der Summe zu einer Abnahme der mtDNA in der Oozyte auf ca. 40 % des Ausgangswertes. Interessanterweise zeigen diese Embryonen im Blastozystenstadium bereits wieder gleich hohe mtDNA-Werte wie die Kontrollgruppe, es kommt also offensichtlich bereits in diesem frühen Entwicklungsstadium zu einer Replikation der mtDNA. Die Embryonalentwicklung war durch diese Interspezies-Heteroplasmie nicht beeinträchtigt. Es konnte gezeigt werden, dass Ooplasmatransfer nach Zentrifugation der Oozyte eine wirksame Methode ist, um den Anteil an Donor-mtDNA zu erhöhen. Es konnte eine Steigerung von 12 % auf 24 % erreicht werden. Eine Möglichkeit, diesen Wert noch zu erhöhen und auf die geforderten 50 % zu kommen, wäre, nicht nur die Rezipientenoozyte, sondern auch die Donoroozyte zu zentrifugieren.

Bis zur Geburt ging allerdings ein großer Teil der übertragenen *B. primigenius indicus*-mtDNA wieder verloren (Abb. 3). Es besteht also auch beim Rind ein Unterschied in der Segregation der mtDNA zwischen zwei Subspezies, wie er schon bei Mäusen gezeigt wurde (TAKEDA et al. 2000). Trotzdem wurde die Heteroplasmie in die Keimbahn vererbt, wie anhand mittels Superovulation gewonnener Oozyten gezeigt werden konnte.

Eine Alternative zum Ooplasmatransfer besteht in der Übertragung der nukleären DNA von einer Oozyte mit pathologischer mtDNA in eine gesunde, entkernte Oozyte.

Zwei Methoden wurden dafür kürzlich vorgestellt. Beim Rhesusaffen der Spindel-Chromosomen-Komplex-Transfer, bei dem nur die Chromosomen übertragen werden (TACHIBA-

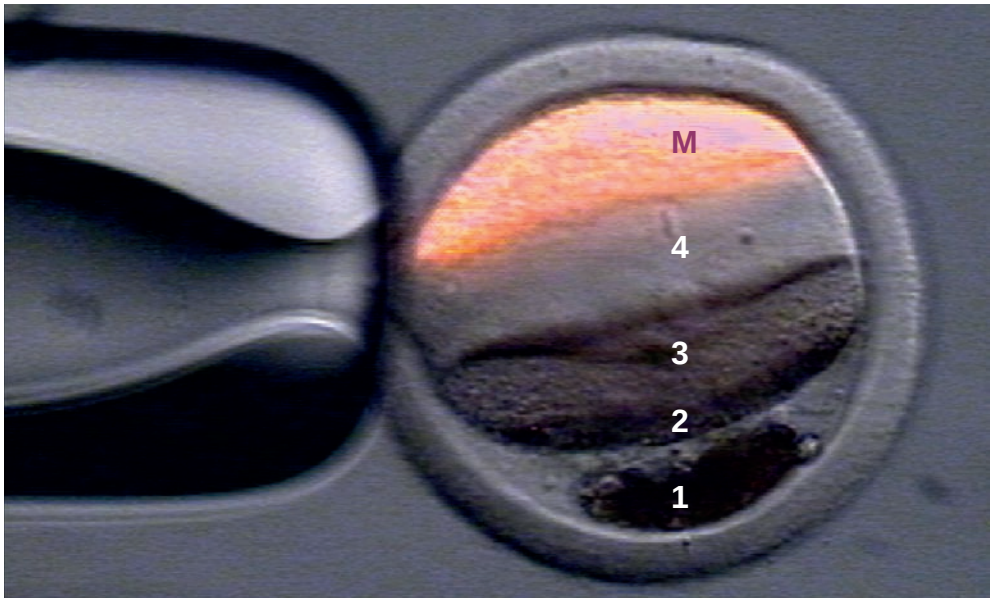


Abb. 2 Mitochondrien mit intaktem Membranpotential wurden innerhalb einer bovinen Oozyte durch Zentrifugation bei $10000 \times g$ angereichert. Fraktionen: 1, Lipide; 2, Membrangebundene Vesikel; 3, Glattes Endoplasmatisches Retikulum; 4, Organellenfreies Ooplasma; M, Mitochondrien. Färbung: MitoTracker Red CMXRos; Invitrogen).

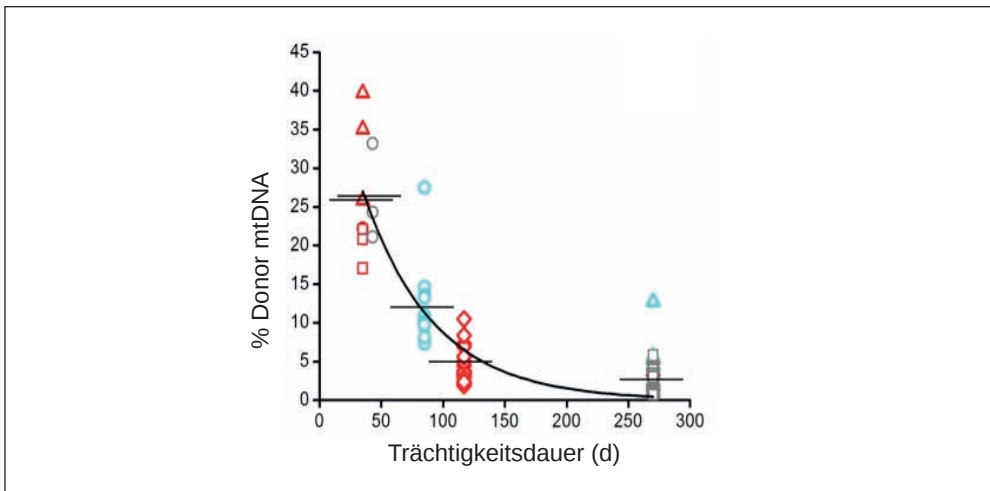


Abb. 3 Exponentielle Abnahme der Donor-mtDNA (*B. primigenius indicus*) während der Gravidität. Gleiche Symbole zeigen gleiche Tiere. Die Regressionsanalyse zeigt eine negative exponentielle Funktion ($r^2 = 0,78$) (modifiziert nach FERREIRA et al. 2010).

NA et al. 2009). Dabei kommt es zum Austausch von über 95 % der mtDNA. Beim Menschen der Pronukleartransfer, bei dem die Vorkerne einer Zygote ausgetauscht werden und 98 % der mtDNA übertragen werden (CRAVEN et al. 2010). Obwohl diese Versuche aus ethischen Gründen nur bei abnormal fertilisierten Oozyten durchgeführt wurden, entfachten sie doch eine neuerliche Diskussion über die Vertretbarkeit solcher gentechnischer Eingriffe beim Menschen. Jedenfalls konnte aber gezeigt werden, dass beide Methoden potenziell geeignet sind, die Übertragung von pathologischer mtDNA zu verhindern.

Sowohl beim Ooplasmtransfer als auch beim Spindel-Chromosomen-Komplex-Transfer und Pronukleartransfer müssen nicht nur ethische, sondern auch funktionelle Fragen zur mtDNA-Heteroplasmie geklärt werden, bevor es zu einem (weiteren) Einsatz in der Humanmedizin kommen kann.

9. Ausblick

Eines der Hauptprobleme der Erforschung der mitochondrialen Genetik ist, dass mtDNA zwar *in vitro* mutiert werden kann, eine gerichtete gentechnische Modifizierung bis heute allerdings nicht möglich ist (CHINNERY und SCHON 2003). Deshalb beschränken sich die meisten Studien entweder auf pathologisch veränderte mtDNA, oder sie vergleichen verschiedene Typen der mtDNA von Labortieren. Diese stammen allerdings meist nur von wenigen Muttertieren ab und zeigen eine dementsprechend geringe Variabilität der mtDNA (GOLOS et al. 2007). Zumindest dieser Engpass könnte in naher Zukunft beseitigt werden, da durch neue Sequenzierungsmethoden viele neue mtDNA-Typen gefunden werden. Studien, die auf eine größere Vielfalt von mtDNAs zurückgreifen können, werden unser Wissen über die mitochondriale Genetik sicher vermehren und helfen, das Zusammenspiel zwischen dem mitochondrialen und dem Kerngenom besser zu verstehen.

Literatur

- ACTON, B. M., LAI, I., SHANG, X., JURISICOVA, A., and CASPER, R. F.: Neutral mitochondrial heteroplasmy alters physiological function in mice. *Biol. Reprod.* 77, 569–576 (2007)
- ASHLEY, M. V., LAIPIS, P. J., and HAUSWIRTH, W. W.: Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 17, 7325–7331 (1989)
- BARANOWSKA, I., JADERLUND, K. H., NENNESMO, I., HOLMQVIST, E., HEIDRICH, N., LARSSON, N. G., ANDERSSON, G., WAGNER, E. G., HEDHAMMAR, A., WIBOM, R., and ANDERSSON, L.: Sensory ataxic neuropathy in golden retriever dogs is caused by a deletion in the mitochondrial tRNA^{Tyr} gene. *PLoS Genet.* 5, e1000499 (2009)
- BARRITT, J. A., BRENNER, C. A., MALTER, H. E., and COHEN, J.: Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Hum. Reprod.* 16, 513–516 (2001)
- 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)
- BREDENOORD, A. L., PENNING, G., and WERT, G. DE: Ooplasmic and nuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disorders: conceptual and normative issues. *Hum. Reprod. Update* 14, 669–678 (2008)
- BURGSTALLER, J. P., SCHINOGL, P., DINNYES, A., MULLER, M., and STEINBORN, R.: Mitochondrial DNA heteroplasmy in ovine fetuses and sheep cloned by somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev. Biol.* 7, 141 (2007)
- CHINNERY, P. F., und SCHON, E. A.: Mitochondria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 1188–1199 (2003)
- CRAVEN, L., TUPPEN, H. A., GREGGAINS, G. D., HARBOTTLE, S. J., MURPHY, J. L., CREE, L. M., MURDOCH, A. P., CHINNERY, P. F., TAYLOR, R. W., LIGHTOWLERS, R. N., HERBERT, M., and TURNBULL, D. M.: Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* 465, 82–85 (2010)

- CREE, L. M., SAMUELS, D. C., and CHINNERY, P. F.: The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 1097–1102 (2009)
- DA FONSECA, R. R., JOHNSON, W. E., O'BRIEN, S. J., RAMOS, M. J., and ANTUNES, A.: The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics* 9, 119 (2008)
- DIEHL, F., SCHMIDT, K., CHOTI, M. A., ROMANS, K., GOODMAN, S., LI, M., THORNTON, K., AGRAWAL, N., SOKOLL, L., SZABO, S. A., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., and DIAZ, L. A., Jr.: Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Med.* 14, 985–990 (2008)
- EDGAR, D., and TRIFUNOVIC, A.: The mtDNA mutator mouse: Dissecting mitochondrial involvement in aging. *Aging (Albany NY)* 1, 1028–1032 (2009)
- FAN, W., WAYMIRE, K. G., NARULA, N., LI, P., ROCHER, C., COSKUN, P. E., VANNAN, M. A., NARULA, J., MACGREGOR, G. R., and WALLACE, D. C.: A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science* 319, 958–962 (2008)
- FERREIRA, C. R., BURGSTALLER, J. P., PERECIN, F., GARCIA, J. M., CHIARATTI, M. R., MEO, S. C., MULLER, M., SMITH, L. C., MEIRELLES, F. V., and STEINBORN, R.: Pronounced segregation of donor mitochondria introduced by bovine ooplasmic transfer to the female germ-line. *Biol. Reprod.* 82, 563–571 (2010)
- FERREIRA, C. R., MEIRELLES, F. V., YAMAZAKI, W., CHIARATTI, M. R., MEO, S. C., PERECIN, F., SMITH, L. C., and GARCIA, J. M.: The kinetics of donor cell mtDNA in embryonic and somatic donor cell-derived bovine embryos. *Cloning Stem Cells* 9, 618–629 (2007)
- GALTIER, N., JOBSON, R. W., NABHOLZ, B., GLEMIN, S., and BLIER, P. U.: Mitochondrial whims: metabolic rate, longevity and the rate of molecular evolution. *Biol. Lett.* 5, 413–416 (2009)
- GIBBS, R. A., TAYLOR, J. F., VAN TASSELL, C. P., BARENDSE, W., EVERSOLE, K. A., GILL, C. A., GREEN, R. D., HARMER, D. L., KAPPES, S. M., LIEN, S., MATUKUMALLI, L. K., MCEWAN, J. C., NAZARETH, L. V., SCHNABEL, R. D., WEINSTOCK, G. M., WHEELER, D. A., AJMONE-MARSAN, P., BOETTCHER, P. J., CAETANO, A. R., GARCIA, J. F., HANOTTE, O., MARIANI, P., SKOW, L. C., SONSTEGARD, T. S., WILLIAMS, J. L., DIALLO, B., HAILEMARIAM, L., MARTINEZ, M. L., MORRIS, C. A., SILVA, L. O., SPELMAN, R. J., MULATU, W., ZHAO, K., ABBEY, C. A., AGABA, M., ARAUJO, F. R., BUNCH, R. J., BURTON, J., GORNI, C., OLIVIER, H., HARRISON, B. E., LUFF, B., MACHADO, M. A., MWAKAYA, J., PLASTOW, G., SIM, W., SMITH, T., THOMAS, M. B., VALENTINI, A., WILLIAMS, P., WOMACK, J., WOOLLIAMS, J. A., LIU, Y., QIN, X., WORLEY, K. C., GAO, C., JIANG, H., MOORE, S. S., REN, Y., SONG, X. Z., BUSTAMANTE, C. D., HERNANDEZ, R. D., MUZY, D. M., PATIL, S., SAN LUCAS, A., FU, Q., KENT, M. P., VEGA, R., MATUKUMALLI, A., MCWILLIAM, S., SCLEP, G., BRYC, K., CHOI, J., GAO, H., GREFENSTETTE, J. J., MURDOCH, B., STELLA, A., VILLA-ANGULO, R., WRIGHT, M., AERTS, J., JANN, O., NEGRINI, R., GODDARD, M. E., HAYES, B. J., BRADLEY, D. G., BARBOSA DA SILVA, M., LAU, L. P., LIU, G. E., LYNN, D. J., PANZITTA, F., and DODDS, K. G.: Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science* 324, 528–532 (2009)
- GILKERSON, R. W.: Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1899–1906 (2009)
- GILKERSON, R. W., SCHON, E. A., HERNANDEZ, E., and DAVIDSON, M. M.: Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation. *J. Cell Biol.* 181, 1117–1128 (2008)
- GOIOS, A., PEREIRA, L., BOGUE, M., MACAULAY, V., and AMORIM, A.: mtDNA phylogeny and evolution of laboratory mouse strains. *Genome Res.* 17, 293–298 (2007)
- GYLLENSTEN, U., WHARTON, D., JOSEFSSON, A., and WILSON, A. C.: Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352, 255–257 (1991)
- HAAG-LIAUTARD, C., COFFEY, N., HOULE, D., LYNCH, M., CHARLESWORTH, B., and KEIGHTLEY, P. D.: Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 6, e204 (2008)
- HAUSWIRTH, W. W., and LAIPIS, P. J.: Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4686–4690 (1982)
- HE, Y., WU, J., DRESSMAN, D. C., IACOBUZIO-DONAHUE, C., MARKOWITZ, S. D., VELCULESCU, V. E., DIAZ, L. A., Jr., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., and PAPADOPOULOS, N.: Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 464, 610–614 (2010)
- HIENDLEDER, S., LEWALSKI, H., and JANKE, A.: Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. *Cytogenet. Genome Res.* 120, 150–156 (2008)
- HIENDLEDER, S., SCHMUTZ, S. M., ERHARDT, G., GREEN, R. D., and PLANTE, Y.: Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 54, 24–31 (1999)
- HIENDLEDER, S., ZAKHARTCHENKO, V., WENIGERKIND, H., REICHENBACH, H. D., BRUGGERHOFF, K., PRELLE, K., BREM, G., STOJKOVIC, M., and WOLF, E.: Heteroplasmy in bovine fetuses produced by intra- and inter-subspecific somatic cell nuclear transfer: neutral segregation of nuclear donor mitochondrial DNA in various tissues and evidence for recipient cow mitochondria in fetal blood. *Biol. Reprod.* 68, 159–166 (2003)

- HOLMGREN, D., WAHLANDER, H., ERIKSSON, B. O., OLDFORS, A., HOLME, E., and TULINIUS, M.: Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease; clinical course and cardiological findings. *Eur. Heart J.* 24, 280–288 (2003)
- IBORRA, F. J., KIMURA, H., and COOK, P. R.: The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol.* 2, 9 (2004)
- INOUE, K., OGONUKI, N., YAMAMOTO, Y., TAKANO, K., MIKI, H., MOCHIDA, K., and OGURA, A.: Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer. *Genesis* 39, 79–83 (2004)
- IRWIN, J. A., SAUNIER, J. L., NIEDERSTATTER, H., STROUSS, K. M., STURK, K. A., DIEGOLI, T. M., BRANDSTATTER, A., PARSON, W., and PARSONS, T. J.: Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. *J. Mol. Evol.* 68, 516–527 (2009)
- JADERLUND, K. H., ORVIND, E., JOHNSSON, E., MATIASEK, K., HAHN, C. N., MALM, S., and HEDHAMMAR, A.: A neurologic syndrome in golden retrievers presenting as a sensory ataxic neuropathy. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 1307–1315 (2007)
- JENUTH, J. P., PETERSON, A. C., FU, K., and SHOUBRIDGE, E. A.: Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nature Genet.* 14, 146–151 (1996)
- JENUTH, J. P., PETERSON, A. C., and SHOUBRIDGE, E. A.: Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nature Genet.* 16, 93–95 (1997)
- MEIRELLES, F. V., BORDIGNON, V., WATANABE, Y., WATANABE, M., DAYAN, A., LOBO, R. B., GARCIA, J. M., and SMITH, L. C.: Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics* 158, 351–356 (2001)
- MEIRELLES, F. V., and SMITH, L. C.: Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. *Genetics* 145, 445–451 (1997)
- MORENO-LOSHUERTOS, R., ACIN-PEREZ, R., FERNANDEZ-SILVA, P., MOVILLA, N., PEREZ-MARTOS, A., RODRIGUEZ DE CORDOBA, S., GALLARDO, M. E., and ENRIQUEZ, J. A.: Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nature Genet.* 38, 1261–1268 (2006)
- NABHOLZ, B., GLEMIN, S., and GALTIER, N.: Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals—the longevity hypothesis. *Mol. Biol. Evol.* 25, 120–130 (2008)
- NING, T., XIAO, H., LI, J., HUA, S., and ZHANG, Y. P.: Adaptive evolution of the mitochondrial ND6 gene in the domestic horse. *Genet. Mol. Res.* 9, 144–150 (2010)
- ROSSIGNOL, R., FAUSTIN, B., ROCHER, C., MALGAT, M., MAZAT, J. P., and LETELLIER, T.: Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* 370, 751–762 (2003)
- SACCONI, S., SALVIATI, L., NISHIGAKI, Y., WALKER, W. F., HERNANDEZ-ROSA, E., TREVISSON, E., DELPLACE, S., DESNUELLE, C., SHANSKE, S., HIRANO, M., SCHON, E. A., BONILLA, E., DE VIVO, D. C., DiMAURO, S., and DAVIDSON, M. M.: A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1814–1820 (2008)
- SCHWARTZ, M., and VISSING, J.: Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New Engl. J. Med.* 347, 576–580 (2002)
- SHOUBRIDGE, E. A.: Mitochondrial DNA segregation in the developing embryo. *Hum. Reprod.* 15 Suppl. 2, 229–234 (2000)
- SILLS, E. S., TAKEUCHI, T., TUCKER, M. J., and PALERMO, G. D.: Genetic and epigenetic modifications associated with human ooplasm donation and mitochondrial heteroplasmy – considerations for interpreting studies of heritability and reproductive outcome. *Med. Hypotheses* 62, 612–617 (2004)
- STEINBORN, R., SCHINOGL, P., WELLS, D. N., BERGTHALER, A., MULLER, M., and BREM, G.: Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics* 162, 823–829 (2002)
- STEINBORN, R., SCHINOGL, P., ZAKHARTCHENKO, V., ACHMANN, R., SCHERNTHANER, W., STOJKOVIC, M., WOLF, E., MULLER, M., and BREM, G.: Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nature Genet.* 25, 255–257 (2000)
- STEINBORN, R., ZAKHARTCHENKO, V., JELIAZKOV, J., KLEIN, D., WOLF, E., MULLER, M., and BREM, G.: Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. *FEBS Lett.* 426, 352–356 (1998)
- STEWART, J. B., FREYER, C., ELSON, J. L., and LARSSON, N. G.: Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. *Nature Rev. Genet.* 9/9, 657–662 (2008)
- SUTARNO, CUMMINS, J. M., GREEFF, J., and LYMBERY, A. J.: Mitochondrial DNA polymorphisms and fertility in beef cattle. *Theriogenology* 57, 1603–1610 (2002)
- SUTOVSKY, P., MORENO, R. D., RAMALHO-SANTOS, J., DOMINKO, T., SIMERLY, C., and SCHATTE, G.: Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, 371–372 (1999)

- SUTOVSKY, P., MORENO, R. D., RAMALHO-SANTOS, J., DOMINKO, T., SIMERLY, C., and SCHATTEN G.: Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol. Reprod.* 63, 582–590 (2000)
- TACHIBANA, M., SPARMAN, M., SRITANAUDOMCHAI, H., MA, H., CLEPPER, L., WOODWARD, J., LI, Y., RAMSEY, C., KOLOTUSHKINA, O., and MITALIPOV, S.: Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 461, 367–372 (2009)
- TAKEDA, K., AKAGI, S., KANEYAMA, K., KOJIMA, T., TAKAHASHI, S., IMAI, H., YAMANAKA, M., ONISHI, A., and HANADA, H.: Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Mol. Reprod. Dev.* 64, 429–437 (2003)
- TAKEDA, K., KANEYAMA, K., TASAI, M., AKAGI, S., TAKAHASHI, S., YONAI, M., KOJIMA, T., ONISHI, A., TAGAMI, T., NIRASAWA, K., and HANADA, H.: Characterization of a donor mitochondrial DNA transmission bottleneck in nuclear transfer derived cow lineages. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 759–765 (2008)
- TAKEDA, K., TAKAHASHI, S., ONISHI, A., GOTO, Y., MIYAZAWA, A., and IMAI, H.: Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J. Reprod. Fertil.* 116, 253–259 (1999)
- TAKEDA, K., TAKAHASHI, S., ONISHI, A., HANADA, H., and IMAI, H.: Replicative advantage and tissue-specific segregation of RR mitochondrial DNA between C57BL/6 and RR heteroplasmic mice. *Genetics* 155, 777–783 (2000)
- TAKEDA, K., TASAI, M., IWAMOTO, M., AKITA, T., TAGAMI, T., NIRASAWA, K., HANADA, H., and ONISHI, A.: Transmission of mitochondrial DNA in pigs and progeny derived from nuclear transfer of Meishan pig fibroblast cells. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 306–312 (2006)
- TRIFUNOVIC, A., WREDENBERG, A., FALKENBERG, M., SPELBRINK, J. N., ROVIO, A. T., BRUDER, C. E., BOHLOOLY, Y. M., GIDLOF, S., OLDFORS, A., WIBOM, R., TORNELL, J., JACOBS, H. T., and LARSSON, N. G.: Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417–423 (2004)
- WAI, T., AO, A., ZHANG, X., CYR, D., DUFORT, D., and SHOUBRIDGE, E. A.: The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol. Reprod.* 83/1, 52–62 (2010)
- WAI, T., TEOLI, D., and SHOUBRIDGE, E. A.: The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature Genet.* 40, 1484–1488 (2008)
- WALLACE, D. C.: Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482–1488 (1999)
- WHITE, D. J., WOLFF, J. N., PIERSON, M., and GEMMELL, N. J.: Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol. Ecol.* 17, 4925–4942 (2008)
- ZHANG, B., CHEN, H., HUA, L., ZHANG, C., KANG, X., WANG, X., PAN, C., LAN, X., and LEI, C.: Novel SNPs of the mtDNA ND5 gene and their associations with several growth traits in the Nanyang cattle breed. *Biochem. Genet.* 46, 362–368 (2008)

Jörg BURGSTALLER
 Institut für Tierzucht und Genetik
 Veterinärmedizinische Universität Wien
 Veterinärplatz 1
 1210 Wien
 Österreich
 Tel.: +43 2272 66280/612
 E-Mail: Joerg.Burgstaller@vetmeduni.ac.at

Zirkulierende Nukleinsäuren Vergangenheit – Gegenwart – Zukunft

Bertram BRENIG ML (Göttingen)

Mit 1 Abbildung und 2 Tabellen

Zusammenfassung

Zirkulierende Nukleinsäuren im Plasma und Serum (CNAPS oder CNA) wurden erstmals Mitte des letzten Jahrhunderts beim Menschen beschrieben. Die intensive Erforschung begann jedoch erst, nachdem moderne molekularbiologische Methoden, wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion, zur Verfügung standen. In den letzten Jahren erhielt die Forschung auf dem Gebiet der CNAs erneut einen enormen Schub durch den Einsatz von Hochdurchsatzsequenzierautomaten. Seither hat sich das Gebiet stetig weiter entwickelt und vor allem im Bereich der Diagnostik neue Möglichkeiten eröffnet. Der folgende Beitrag soll einen kurzen Überblick über den momentanen Stand der Erkenntnisse auf dem Gebiet der CNAs geben.

Abstract

Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS or CNA) in man have been described already in the middle of the last century. However, an intensive research on CNAs started only when modern molecular biological methods became available, e.g. the polymerase chain reaction. In recent years the investigation of CNAs again experienced an enormous stimulus through the development and application of high-throughput sequencing. Since then the CNA field has developed constantly and has opened new possibilities especially in DNA-based diagnosis. The following article will give a short overview of the state of the art and potential new developments.

1. Entdeckung und Eigenschaften zirkulierender Nukleinsäuren

Im Serum bzw. Plasma zirkulieren in einem nicht unerheblichen Umfang freie und in Mikrovessikeln (Exosomen) verpackte Nukleinsäuren (FLEISCHHACKER und SCHMIDT 2007, SWARUP und RAJESWARI 2007). Dabei handelt es sich sowohl um DNAs als auch RNAs, die als Reaktion eines Organismus auf z. B. akute oder chronische entzündliche, degenerative, traumatische oder infektiöse Erkrankungen aktiv sezerniert bzw. durch Apoptose oder Nekrose freigesetzt werden (Abb. 1). Die Konzentration von Nukleinsäuren im Blut gesunder Probanden beträgt durchschnittlich 1,8–35 ng/ml DNA und 2,5 ng/ml RNA. Als Folge unterschiedlicher Erkrankungen kann die Konzentration jedoch auf Werte bis zu 3000 ng/ml ansteigen. Obwohl über das Vorkommen von CNAs sowohl bei gesunden als auch erkrankten Individuen bereits 1948 von MANDEL und MÉTAIS berichtet wurde, kam es erst nach der Beschreibung von CNAs bei Patienten mit systemischen Lupus erythematosus und verschiedenen Tumorerkrankungen zu einem gesteigerten Interesse an der Erforschung der Herkunft, Funktion und des eventuellen Einsatzes von CNAs in der medizinischen Diagnostik (LEON et al. 1977a, b, TAN et al. 1966).

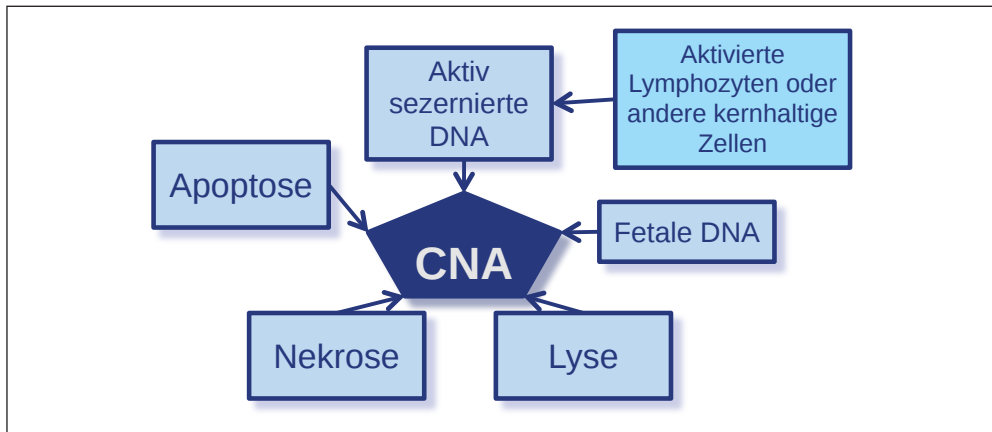


Abb. 1 Herkunft zirkulierender Nukleinsäuren (modifiziert nach SWARUP und RAJESWARI 2007, mit freundlicher Genehmigung von Dr. J. BECK). Die Abbildung zeigt die sechs möglichen Herkünfte zirkulierender Nukleinsäuren im Plasma und Serum. Im Wesentlichen ist die Herkunft von CNAs auf apoptotische Prozesse und aktive Sekretion zurückzuführen.

Eine konsequente Analyse von CNAs wurde aber erst möglich, nachdem hochsensitive molekulare Techniken (z. B. PCR) zur Verfügung standen. Pionierarbeit leisteten dabei vor allem die beiden französischen Wissenschaftler Philippe ANKER und Maurice STROUN, die bereits 1975 zirkulierende Nukleinsäuren in menschlichem Plasma beschrieben und näher untersuchten (ANKER et al. 1975, 1976, STROUN et al. 1977). In den folgenden Jahrzehnten hat sich daraus ein hoch interessantes und dynamisches Forschungsgebiet entwickelt, was u. a. auch seinen Ausdruck in der im November 2009 zum sechsten Mal durchgeführten internationalen Konferenz über CNAPS („Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum, CNAPS-VI“) in Hong Kong findet.

Inzwischen konnten CNAs in einer Reihe ganz unterschiedlicher Symptomaten nachgewiesen werden. Einen kleinen Überblick über das Vorkommen von CNAs bei unterschiedlichen Erkrankungen gibt Tabelle 1 wieder. DNA-Plasmaspiegel zeigen sich als geeignet zum Nachweis und zur Prognostik von Traumapatienten (LO et al. 2000). Bei chronischen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis (LEON et al. 1977a), und Autoimmunerkrankungen, wie systemischer Lupus erythematosus (TAN et al. 1966), wurden zirkulierende Serumnukleinsäuren ebenso nachgewiesen wie bei Infektionskrankheiten (ANKER und STROUN 2000, FLEISCHHACKER 1999, LO 2001). In der Onkologie dient der Nachweis von aus Tumorgewebe oder von Viren stammenden Nukleinsäuren in Serum oder Plasma der Diagnostik, Prognostik sowie der Kontrolle des Therapieerfolges. Studien hierzu reichen zurück bis in die 1970er Jahre (LEON et al. 1977b).

Wie derartige CNAs gebildet werden und welche Funktion sie haben, ist gegenwärtig noch nicht vollständig bekannt. Wie bereits oben erwähnt gibt es theoretisch sechs verschiedene Herkünfte von CNAs (Abb. 1). Momentan wird jedoch die Herkunft der CNAs aus apoptotischen Vorgängen und aktiver Sekretion als wesentliche Quelle angenommen. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von CNAs zeigt sich in der Regel eine DNA-Leiter und kein Schmier, wobei die DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 180–1000 bp liegen. Bei nekrotischen Prozessen würde man dagegen eher einen Schmier in einem unterschiedli-

Tab. 1 Vorkommen von CNAs im Plasma und Serum von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen

Erkrankung	Nukleinsäure	Referenz
Systemischer Lupus erythematosus	DNA	TAN et al. 1966
Hirnschlag	DNA	RAINER et al. 2003
Trauma	DNA	LAM et al. 2003
Herzinfarkt	DNA	CHANG et al. 2003
Trauma	RNA	LACTIONOV et al. 2004
Multiple Sklerose	DNA	BECK et al. 2010b
Mammakarzinom	DNA	BECK et al. 2010a

chen Größenbereich erhalten, der keine spezifischen Bandenmuster aufweisen würde. Neben der Apoptose werden CNAs aber auch zellfrei oder in DNA/RNA-Lipoprotein-Komplexen verpackt ins Blut abgegeben. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass derartige Komplexe von intakten Zellen gebildet und nach ihrer Sekretion von Zielzellen aufgenommen werden können, um dort verschiedene zelluläre Veränderungen bzw. Reaktionen zu induzieren. Hierzu gehören z. B. die Induktion von Krebs, die Veränderung der Kontraktionsrate von Herzmuskelzellen, Antikörperbildung, die Initiation und der Abbruch der DNA-Synthese (GAHAN 2006, GAHAN et al. 2008). Spezifische CNA wurden u. a. im Urin entdeckt, und daher scheint eine renale Ausscheidung als sehr wahrscheinlich (LO et al. 2000, TSUMITA und IWANAGA 1963).

Eine detaillierte Studie über die Zusammensetzung humaner CNAs gesunder Individuen wurde kürzlich publiziert (BECK et al. 2009b). Dabei konnte u. a. gezeigt werden, dass sich die CNAs in ihrer Zusammensetzung bezüglich des Vorkommens von Genen oder Genfragmenten, RNAs, kodierenden und untranslatierten Bereichen sowie repetitiven, intergenischen und nichtrepetitiven Regionen, nicht wesentlich von nukleärer chromosomaler DNA unterscheiden. Auch bei der Verteilung der CNAs bezüglich ihrer chromosomalen Herkunft konnte keine Abweichung von der erwarteten genomischen DNA-Mengenverteilung ermittelt werden. Bei einer genaueren Analyse der Zusammensetzung der CNAs im Vergleich zur nukleären genomischen DNA konnten aber hinsichtlich des Anteils von *Alu*-Elementen sowie LINE L1 und L2 Unterschiede gezeigt werden (BROOKFIELD 1994, DEWANNIEUX und HEIDMANN 2005). *Alu*-Elemente waren dabei signifikant über- und L1- bzw. L2-Elemente signifikant unterrepräsentiert. Neben CNAs genomischer Herkunft der Probanden ließen sich außerdem ungefähr 0,16 %, 0,02 % bzw. 0,01 % der CNAs entweder Bakterien-, Virus- bzw. Pilzgenomen zuordnen.

Die Analyse und Erstellung von CNA-Datenbanken von gesunden Individuen ist eine wichtige Voraussetzung für zukünftige Untersuchungen von CNAs bei unterschiedlichen Erkrankungen. Erkrankungsspezifische CNAs lassen sich dann durch den Vergleich mit den normalen Repertoires an CNAs identifizieren.

Untersuchungen mit CNA haben ein neues Feld von Möglichkeiten zur nichtinvasiven, molekularen Diagnostik von Krankheiten eröffnet (TSUI et al. 2002), die weit über den Nachweis von Erreger-DNA hinausgeht. Das Grundprinzip liegt darin, krankheitsspezifische Zellschädigungen oder Zellaktivierungen durch den Nachweis der dabei ins Serum/Plasma freigesetzten Nukleinsäuren zu erkennen. Mit Hilfe von PCR-Techniken können spezifische Bandenmuster dargestellt werden, die für eine bestimmte Krankheit pathognostisch sein können.

2. Zirkulierende Nukleinsäuren bei Tieren

Nukleinsäuren im Serum von Haussäugetieren wurden bisher nur beim Rind im Rahmen von Untersuchungen der Bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) beschrieben (BRENIG et al. 2002, SCHUTZ et al. 2005). Dabei konnten mittels subtraktiver Hybridisierung spezifische BSE-induzierte CNAs identifiziert werden. Es fanden sich Sequenzen mit einer Länge zwischen 109 und 220 bp. Ein gemeinsamer Bereich von 80 bp konnte in jeder dieser Sequenzen nachgewiesen werden. Der 80bp-Bereich zeigte eine sehr hohe Homologie zu einem bovinen SINE, Bov-tA (SCHUTZ et al. 2005). Die Überprüfung der isolierten CNA bei BSE-positiven und Kontrolltieren zeigte eine Spezifität der CNAs mit einer statistischen Signifikanz von $p < 0,001$. Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass Unterschiede zwischen infizierten und gesunden Rindern sich nicht nur in der An- bzw. Abwesenheit spezifischer CNAs ausdrücken, sondern auch die Zusammensetzung der CNAs ein spezifisches Muster aufweist (BECK et al. 2009a). In dieser Studie wurden 15 Rinder mit 100 g BSE-infiziertem Gehirn oral infiziert und 40 Monate nach der Infektion die CNAs aus Serumproben der infizierten Tiere analysiert. Insgesamt wurden $4,64 \times 10^7$ Nukleotide in $5,96 \times 10^5$ Einzelsequenzen untersucht. Die durchschnittliche Länge der untersuchten DNA-Fragmente betrug 78 bp. Die Sequenzdaten der CNAs der infizierten Tiere wurden mit den homologen Sequenzen der Kontrolltiere verglichen. Dabei konnten spezifische Einzelnukleotidvarianten (SNP) zwischen den analysierten Individuen identifiziert werden. Einige der SNPs waren ausschließlich bei den infizierten Tieren nachweisbar. Insgesamt konnten bei der Studie 421 SNPs charakterisiert werden, die in keiner der ca. $3,0 \times 10^5$ Sequenzen der nicht-infizierten gesunden Kontrolltiere auftraten. Mit einer Auswahl von zwei SNPs ließen sich alle BSE-infizierten Tiere innerhalb der untersuchten Kohorte eindeutig erkennen.

Im Rahmen einer anderen Studie konnten TSE¹-spezifische CNAs auch bei an *Chronic Wasting Disease* (CWD) erkrankten kanadischen Rothirschen (*Cervus elaphus*) gefunden werden (GORDON et al. 2009). CNAs wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 25 Monaten nach einer oralen Infektion aus dem Serum von 24 Rothirschen isoliert. Insgesamt wurden aus den Extrakten 657 431 DNA-Sequenzen generiert, von denen 401 733 von infizierten Tieren stammten. Die DNA-Fragmente hatten eine durchschnittliche Länge von 163 bp. Innerhalb der CNAs konnten drei für unterschiedliche CWD-Stadien repräsentative Sequenzen identifiziert werden. Eines der Sequenzmotive erwies sich als spezifisch für Tiere ohne klinische Symptome bis zu 5 Monaten nach der Infektion. Zwei weitere Motive wurden identifiziert, die bei Tieren kurz vor dem Auftreten klinischer Symptome nachweisbar waren. Während in dem ersten Motiv keine besonderen Sequenzabschnitte nachweisbar waren, zeigte sich bei dem zweiten Motiv (Motiv A) eine Homologie zu einer viralen Protein-Bindungsstelle (EVI 1). Das dritte Motiv (Motiv B) zeichnete sich ebenfalls durch das Vorkommen eines besonderen Motivs aus. Hierbei handelte es sich um eine Zinkfinger-Proteinbindungsstelle (PLZF). Ein weiteres Sequenzmotiv (Motiv C), das jedoch keine besonderen bisher bekannten DNA-Abschnitte enthält, wurde bei allen terminalerkrankten Tieren nachgewiesen.

Die Untersuchungen von GORDON et al. (2009) zeigen, dass CNAs nicht nur bei Rindern auftreten, sondern auch bei Rothirschen sehr spezifische CNAs als Reaktion eines Tieres auf eine TSE-Infektion gebildet werden.

¹ TSE – Transmissible spongiforme Enzephalopathie.

Bisher gibt es noch keine weiteren Publikationen zu CNAs bei anderen Tieren. Die bisherigen Ergebnisse bei Rindern und Rothirschen lassen jedoch vermuten, dass auch bei anderen Tierarten CNAs vorkommen. Untersuchungen hierzu sind in Vorbereitung oder haben bereits begonnen. Man darf gespannt sein, welche interessanten Erkenntnisse auf diesem Gebiet zukünftig noch erlangt werden.

3. Einsatz zirkulierender Nukleinsäuren in der Diagnostik

Gegenwärtig werden CNAs bereits als Biomarker in der Humanmedizin eingesetzt. Der Einsatz reicht von der Diagnose, über die Prognose bis hin zu Verlaufskontrollen von Behandlungen bei einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen. Die Analyse ist dabei denkbar einfach, da nach einer Blutentnahme die CNAs aus dem Plasma oder Serum isoliert und anschließend mit Standardverfahren der Molekularbiologie, z. B. PCR und Gelelektrophorese oder DNA-Sequenzierung, untersucht werden können. Auch sehr geringe Mengen an CNAs lassen sich durch „whole genome amplification“ (WGA)-Methoden vorher entsprechend anreichern.

Das diagnostische Potential der CNAs wird gegenwärtig bereits in der Notfallmedizin, Diabetesdiagnostik, Pränatalmedizin und Onkologie ausgenutzt.

In der Tiermedizin und Tierzucht ergeben sich interessante Anwendungen der CNAs im Bereich der Pränataldiagnostik (NIPD, nichtinvasive Pränataldiagnostik). Der Austausch maternalen und fetalen kernhaltiger Zellen ist seit vielen Jahren bekannt und wurde erstmals 1969 beschrieben (LO et al. 1989, 1996, WALKNOWSKA et al. 1969). Mit der Entwicklung der PCR konnte Mitte der 1990er Jahre der Nachweis fetaler Y-Chromosom-spezifischer Sequenzen im Serum der Mutter zur pränatalen Geschlechtsbestimmung eingesetzt werden. Für die Pränataldiagnostik eröffnet der Nachweis zirkulierender, fetaler DNA im mütterlichen Plasma/Serum völlig neue Wege (LO et al. 1997). Neben der Geschlechtsbestimmung ist es inzwischen auch gelungen, unterschiedliche genetische embryonale Defekte mittels CNA-Diagnostik pränatal zu bestimmen (SWAMINATHAN und BUTT 2006). Erst kürzlich konnte sogar ein unterschiedliches Methylierungsmuster des Maspin-Gens in fetaler zirkulierender DNA nachgewiesen werden (CHIM et al. 2005, POON et al. 2002). Tabelle 2 gibt einen Überblick über einige CNAs, die erfolgreich in der NIPD eingesetzt werden. Da die CNA-Diagnostik nichtinvasiv durchgeführt wird, besteht auch nicht die Gefahr eines durch Manipulation bedingten Abortus (LIU et al. 2007).

Für die Diagnostik sind natürlich Fragen zu den Faktoren, die die Zusammensetzung und die Konzentration fetaler DNA im Serum der Mutter (cff-CNA, cell-free fetal CNA) beeinflussen, von großem Interesse. Dies betrifft sowohl den Verlauf der cff-CNA-Konzentration während einer Gravidität als auch Veränderungen, die durch externe Faktoren, z. B. Art der Befruchtung, Fütterung oder Rasse, bedingt sind. Untersuchungen zu diesen Fragen wurden bisher nur beim Menschen durchgeführt. Wichtig für eine frühe Pränataldiagnostik oder sogar präimplantative Diagnostik (PID) ist der Nachweis von cff-CNA kurz nach der Befruchtung bis zur Nidation. Untersuchungen mittels *Real-time*-PCR von WATAGANARA et al. (2004) zeigen, dass cff-CNAs (DYS1) beim Menschen ab dem 32. Tag der Gravidität ohne Probleme nachweisbar sind. Eine frühere Detektion durch Extrapolation der vorliegenden Daten lässt sich ab dem 29. Tag der Gravidität erwarten. Andere Untersuchungen gehen von einem akkuraten und robusten Nachweis der cff-CNA ab der 5. Woche (BIRCH et al. 2005), 6. Woche (STANGHELLINI et al. 2006) oder 8. Woche (GALBIATI et al. 2005) der Gravidität aus. Diese

Tab. 2 Untersuchung von CNAs in der nichtinvasiven Pränataldiagnostik (NIPD)

Erkrankung/Phänotyp	CNA-Biomarker	Referenz
Präeklampsie	Y-chromosomales geschlechts-determinierendes Gen (<i>SRY</i>)	TAO et al. 2005
	ACTH-Gen	Ng et al. 2003
	Maspin-Gen	CHIM et al. 2005
β-Thalassämie	β-Globin-Gen	LI et al. 2005, 2006
	β-Globin-Gen	PAPASAVVA et al. 2008
Geschlechtsbestimmung	Amelogenin-Gen	VECCHIONE et al. 2008
	X-chromosomale Microsatelliten	VECCHIONE et al. 2008
	Y-chromosomale multicopy DAZ	VAINER et al. 2008
Down-Syndrom	Plazenta-spezifisches Protein 4-Gen (<i>PLAC4</i>)	LO et al. 2008
Rhesusfaktor	RHD-Gen	FINNING et al. 2004, HARPER et al. 2004

Ergebnisse dokumentieren, dass die Nachweisgrenze und damit der früheste Zeitpunkt einer Diagnostik noch nicht endgültig bestimmt ist. Durch den Einsatz noch sensitiverer Techniken ist daher zu erwarten, dass cff-CNAs noch zu einem weitaus früheren Zeitpunkt der Gravidität detektiert werden können. Für die Diagnostik beim Rind ist von Interesse, dass auch bei Graviditäten durch *In-vitro*-Fertilisation cff-CNAs nachgewiesen werden konnten (PAN et al. 2005). Außerdem muss beachtet werden, dass sich alle bisherigen Untersuchungen beim Menschen auf den Nachweis fetaler DNA beziehen. Die Veränderung maternaler zirkulierender DNA wurde in keiner Studie bisher berücksichtigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch in der Tierzucht und Tiermedizin eine Vielzahl interessanter Anwendungen der CNAs möglich ist.

4. Schlussfolgerung

Das Gebiet der zirkulierenden Nukleinsäuren befindet sich bei unseren Haussäugtieren noch ganz am Anfang. Jedoch zeigen die Ergebnisse im Bereich der Humanmedizin und erste Erkenntnisse beim Rind und Rothirsch, dass CNAs vor allem in der nichtinvasiven Diagnostik ein enormes Potential besitzen. Dieses wird sich mit Sicherheit zukünftig auch in der Tiermedizin und Tierzucht in zunehmendem Maße ausschöpfen lassen.

Literatur

- ANKER, P., and STROUN, M.: Circulating DNA in plasma or serum. *Medicina (B Aires)* 60, 699–702 (2000)
- ANKER, P., STROUN, M., and MAURICE, P. A.: Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* 35, 2375–2382 (1975)
- ANKER, P., STROUN, M., and MAURICE, P. A.: Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes. *Cancer Res.* 36, 2832–2839 (1976)
- BECK, J., URNOVITZ, H. B., GROSCHUP, M. H., ZIEGLER, U., BRENIG, B., and SCHUTZ, E.: Serum nucleic acids in an experimental bovine transmissible spongiform encephalopathy model. *Zoonoses Public Health* 56, 384–390 (2009a)
- BECK, J., URNOVITZ, H. B., MITCHELL, W. M., and SCHUTZ, E.: Next generation sequencing of serum circulating nucleic acids from patients with invasive ductal breast cancer reveals differences to healthy and nonmalignant controls. *Mol. Cancer Res.* 8, 335–342 (2010a)
- BECK, J., URNOVITZ, H. B., RIGGERT, J., CLERICI, M., and SCHUTZ, E.: Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. *Clin. Chem.* 55, 730–738 (2009b)
- BECK, J., URNOVITZ, H. B., SARESELLA, M., CAPUTO, D., CLERICI, M., MITCHELL, W. M., and SCHUTZ, E.: Serum DNA motifs predict disease and clinical status in multiple sclerosis. *J. Mol. Diagn.* 12, 312–319 (2010b)
- BIRCH, L., ENGLISH, C. A., O'DONOGHUE, K., BARIGYE, O., FISK, N. M., and KEER, J. T.: Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin. Chem.* 51, 312–320 (2005)
- BRENIG, B., SCHUTZ, E., and URNOVITZ, H.: Cellular nucleic acids in serum and plasma as new diagnostic tools. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 115, 122–124 (2002)
- BROOKFIELD, J. F.: The human Alu SINE sequences – is there a role for selection in their evolution? *Bioessays* 16, 793–795 (1994)
- CHANG, C. P., CHIA, R. H., WU, T. L., TSAO, K. C., SUN, C. F., and WU, J. T.: Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta* 327, 95–101 (2003)
- CHIM, S. S., TONG, Y. K., CHIU, R. W., LAU, T. K., LEUNG, T. N., CHAN, L. Y., OUDEJANS, C. B., DING, C., and LO, Y. M.: Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 14753–14758 (2005)
- DEWANNIEUX, M., and HEIDMANN, T.: LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling. *Cytogenet. Genome Res.* 110, 35–48 (2005)
- FINNING, K., MARTIN, P., and DANIELS, G.: A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann. New York Acad. Sci.* 1022, 119–123 (2004)
- FLAISCHACKER, M.: Meeting report – First international symposium on circulating nucleic acids in plasma/serum – Implications in cancer diagnostics, prognosis or follow up and in prenatal diagnosis – Menthon France, August 18–20, 1999. *Eur. J. Med. Res.* 4, 488–490 (1999)
- FLAISCHACKER, M., and SCHMIDT, B.: Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey. *Biochim. Biophys. Acta* 1775, 181–232 (2007)
- GAHAN, P. B.: Circulating DNA: intracellular and intraorgan messenger? *Ann. New York Acad. Sci.* 1075, 21–33 (2006)
- GAHAN, P. B., ANKER, P., and STROUN, M.: Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann. New York Acad. Sci.* 1137, 7–17 (2008)
- GALBIATI, S., SMID, M., GAMBINI, D., FERRARI, A., RESTAGNO, G., VIORA, E., CAMPOGRANDE, M., BASTONERO, S., PAGLIANO, M., CALZA, S., FERRARI, M., and CREMONESI, L.: Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum. Genet.* 117, 243–248 (2005)
- GORDON, P. M., SCHUTZ, E., BECK, J., URNOVITZ, H. B., GRAHAM, C., CLARK, R., DUDAS, S., CZUB, S., SENSEN, M., BRENIG, B., GROSCHUP, M. H., CHURCH, R. B., and SENSEN, C. W.: Disease-specific motifs can be identified in circulating nucleic acids from live elk and cattle infected with transmissible spongiform encephalopathies. *Nucleic Acids Res.* 37, 550–556 (2009)
- HARPER, T. C., FINNING, K. M., MARTIN, P., and MOISE, K. J., Jr.: Use of maternal plasma for noninvasive determination of fetal RhD status. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 191, 1730–1732 (2004)
- LAKTIONOV, P. P., TAMKOVICH, S. N., RYKOVA, E. Y., BRYZGUNOVA, O. E., STARIKOV, A. V., KUZNETSOVA, N. P., SUMAROKOV, S. V., KOLOMIETS, S. A., SEVOSTIANOVA, N. V., and VLASSOV, V. V.: Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23, 879–883 (2004)
- LAM, N. Y., RAINER, T. H., CHAN, L. Y., JOYNT, G. M., and LO, Y. M.: Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin. Chem.* 49, 1286–1291 (2003)

- LEON, S. A., EHRLICH, G. E., SHAPIRO, B., and LABBATE, V. A.: Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J. Rheumatol.* 4, 139–143 (1977a)
- LEON, S. A., SHAPIRO, B., SKLAROFF, D. M., and YAROS, M. J.: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 37, 646–650 (1977b)
- LI, D., LIAO, C., LI, J., XIE, X., HUANG, Y., ZHONG, H., and WEI, J.: Prenatal diagnosis of beta-thalassemia in Southern China. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 128, 81–85 (2006)
- LI, Y., DI NARO, E., VITUCCI, A., ZIMMERMANN, B., HOLZGREVE, W., and HAHN, S.: Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 293, 843–849 (2005)
- LIU, F. M., WANG, X. Y., FENG, X., WANG, W., YE, Y. X., and CHEN, H.: Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 86, 535–541 (2007)
- LO, T. K., LAU, W. L., LAI, F. K., LAM, H. S., TSE, H. Y., LEUNG, W. C., and CHIN, R. K.: Effect of fetal diagnosis on the outcomes of second-trimester pregnancy termination for fetal abnormalities: a pilot study. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 21, 523–527 (2008)
- LO, Y. M.: Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. *Ann. New York Acad. Sci.* 945, 1–7 (2001)
- LO, Y. M., RAINER, T. H., CHAN, L. Y., HJELM, N. M., and COCKS, R. A.: Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin. Chem.* 46, 319–323 (2000)
- LO, Y. M., PATEL, P., WAINSCOT, J. S., SAMPIETRO, M., GILLMER, M. D., and FLEMING, K. A.: Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 2, 1363–1365 (1989)
- LO, Y. M., LO, E. S., WATSON, N., NOAKES, L., SARGENT, I. L., THILAGANATHAN, B., and WAINSCOT, J. S.: Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 88, 4390–4395 (1996)
- LO, Y. M., CORBETTA, N., CHAMBERLAIN, P. F., RAI, V., SARGENT, I. L., REDMAN, C. W., and WAINSCOT, J. S.: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, 485–487 (1997)
- MANDEL, P., and MÉTAIS, P.: Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Acad. Sci. Paris* 142, 241–243 (1948)
- NG, E. K., LEUNG, T. N., TSUI, N. B., LAU, T. K., PANESAR, N. S., CHIU, R. W., and LO, Y. M.: The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin. Chem.* 49, 727–731 (2003)
- PAN, P. D., PETER, I., LAMBERT-MESSERLIAN, G. M., CANICK, J. A., BIANCHI, D. W., and JOHNSON, K. L.: Cell-free fetal DNA levels in pregnancies conceived by IVF. *Hum. Reprod.* 20, 3152–3156 (2005)
- PAPASAVVA, T., KALIKAS, I., KYRRI, A., and KLEANTHOUS, M.: Arrayed primer extension for the noninvasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia based on detection of single nucleotide polymorphisms. *Ann. New York Acad. Sci.* 1137, 302–308 (2008)
- POON, L. L., LEUNG, T. N., LAU, T. K., CHOW, K. C., and LO, Y. M.: Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 48, 35–41 (2002)
- RAINER, T. H., WONG, L. K., LAM, W., YUEN, E., LAM, N. Y., METREWELI, C., and LO, Y. M.: Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin. Chem.* 49, 562–569 (2003)
- SCHUTZ, E., URNOVITZ, H. B., IAKOUBOV, L., SCHULZ-SCHAEFFER, W., WEMHEUER, W., and BREINIG, B.: Bov-tA short interspersed nucleotide element sequences in circulating nucleic acids from sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy (BSE) and sera of cattle exposed to BSE. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 814–820 (2005)
- STANGHELLINI, I., BERTORELLI, R., CAPONE, L., MAZZA, V., NERI, C., PERCESEPE, A., and FORABOSCO, A.: Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 587–591 (2006)
- STROUN, M., ANKER, P., MAURICE, P., and GAHAN, P. B.: Circulating nucleic acids in higher organisms. *Int. Rev. Cytol.* 51, 1–48 (1977)
- SWAMINATHAN, R., and BUTT, A. N.: Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments. *Ann. New York Acad. Sci.* 1075, 1–9 (2006)
- SWARUP, V., and RAJESWARI, M. R.: Circulating (cell-free) nucleic acids – a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* 581, 795–799 (2007)
- TAN, E. M., SCHUR, P. H., CARR, R. I., and KUNKEL, H. G.: Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 45, 1732–1740 (1966)
- TAO, H., WANG, X. M., and JI, X. H.: Study on the relation between concentration of circulating non-host fetal DNA in pregnant women and pre-eclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 40, 808–811 (2005)
- TSUI, N. B., NG, E. K., and LO, Y. M.: Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin. Chem.* 48, 1647–1653 (2002)
- TSUMITA, T., and IWANAGA, M.: Fate of injected deoxyribonucleic acid in mice. *Nature* 198, 1088–1089 (1963)

- VAINER, O. B., KATOKHIN, A. V., KUSTOV, S. M., VLASSOV, V. V., and LAKTIONOV, P. P.: A new Y chromosome marker for noninvasive fetal gender determination. *Ann. New York Acad. Sci.* 1137, 157–161 (2008)
- VECCHIONE, G., TOMAIUOLO, M., SARNO, M., COLAIZZO, D., PETRAROLI, R., MATTEO, M., GRECO, P., GRANDONE, E., and MARGAGLIONE, M.: Fetal sex identification in maternal plasma by means of short tandem repeats on chromosome x. *Ann. New York Acad. Sci.* 1137, 148–156 (2008)
- WALKNOWSKA, J., CONTE, F. A., and GRUMBACH, M. M.: Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet I*, 1119–1122 (1969)
- WATAGANARA, T., CHEN, A. Y., LESHANE, E. S., SULLIVAN, L. M., BORGATTA, L., BIANCHI, D. W., and JOHNSON, K. L.: Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil. Steril.* 81, 638–644 (2004)

Prof. Dr. Bertram BRENIG
Tierärztliches Institut
Georg-August-Universität Göttingen
Burckhardtweg 2
37077 Göttingen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 551 393383
Fax: +49 551 393392
E-Mail: bbrenig@gwdg.de

**Festliche Übergabe des Präsidentenamtes
der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina –
Nationale Akademie der Wissenschaften
von Volker ter Meulen an Jörg Hacker**

am 26. Februar 2010 in der Aula des Löwengebäudes der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 113, Nr. 385

Herausgegeben vom Präsidium der Akademie

(2010, 84 Seiten, 23 Abbildungen, DVD mit der Dokumentation der Veranstaltung,
21,95 Euro, ISBN: 978-3-8047-2848-6)

Am 26. Februar 2010 fand in der Aula des Löwengebäudes der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg die Feierliche Übergabe des Leopoldina-Präsidentenamtes von Volker TER MEULEN an Jörg HACKER statt. Der Band enthält die Begrüßung durch die Leopoldina-Vizepräsidentin Bärbel FRIEDRICH, die Grußworte der Bundesministerin für Bildung und Forschung Annette SCHAVAN und des Ministerpräsidenten des Landes Sachsen-Anhalt Wolfgang BÖHMER. Im Mittelpunkt stehen die Ansprache des scheidenden XXV. Präsidenten Volker TER MEULEN und die Antrittsrede des XXVI. Präsidenten Jörg HACKER. Ergänzt wird der Band durch die Festrede „Wissenschaftskultur – Zur Vernunft wissenschaftlicher Institutionen“ von Jürgen MITTELSTRASS. Alle Beiträge sind in deutscher und englischer Sprache abgedruckt.

Quantification of Genetic Variation in Livestock Species

Jörn BENNEWITZ (Stuttgart)

With 1 Table

Abstract

Genetic diversity within livestock species can be found within and between breeds. It is not a constant, but is threatened by extinction of breeds and by inbreeding and genetic drift. The need to conserve genetic diversity is widely accepted. It was shown that those breeds should be conserved that contribute to genetic diversity (which are not always the most endangered breeds). This involves the need to measure the genetic diversity using an appropriate diversity measure. For this purpose a kinship based core set diversity measure is presented that considers both between and within breed diversity and fulfils the so-called Weitzman criteria for a proper diversity measure. It values breed with a high within breed kinship that are not related to other breeds in order to maximise the total additive genetic variance of a quantitative trait. A stochastic algorithm for the estimation of breed marginal diversities is described that is tailored to analyse large data sets. It considers putative future changes of marginal diversities due to genetic drift. Marginal diversities can be used to prioritise breeds for conservation. The methods were applied to a real data set consisting of nine genotyped cattle breeds, demonstrating the usefulness of the approach. In future it is assumed that next to the neutral MVT-diversity also adaptive diversity will play an important role in making conservation decision.

Zusammenfassung

Die genetische Diversität landwirtschaftlich genutzter Spezies ist innerhalb und zwischen Rassen zu finden. Sie ist nicht konstant, sondern durch z. T. begrenzte effektive Populationsgrößen und Aussterben von Rassen bedroht. Die Notwendigkeit der Erhaltung der genetischen Diversität ist aus unterschiedlichen Gründen weitgehend akzeptiert, und es wurden weltweit Erhaltungsprogramme etabliert. Dabei kommt der Auswahl der Rassen für ein Erhaltungsprogramm eine zentrale Bedeutung zu. In der Vergangenheit wurden oftmals die am meisten gefährdeten Rassen ausgewählt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Auswahl nach dem Beitrag der einzelnen Rassen zur Diversität wesentlich sinnvoller ist. Die Identifikation solcher Rassen setzt voraus, dass ein geeignetes Diversitätsmaß verwendet wird, welches beide Komponenten der Diversität (innerhalb und zwischen Rassen) mit entsprechender Gewichtung berücksichtigt. Ein solches Diversitätsmaß ist die neutrale MVT-Diversität. Sie misst den Anteil der genetischen Variation eines hypothetischen quantitativen Merkmals, welches von einem definierten Set von Rassen zum jetzigen und zu einem zukünftigen Zeitpunkt konserviert wird. Letzteres setzt voraus, dass Aussterbewahrscheinlichkeiten der Rassen abgeleitet werden können. Das MVT-Diversitätsmaß hat eine eindeutige quantitativ-genetische Fundierung und erfüllt die sogenannten Weitzman-Kriterien für ein ‚sinnvolles‘ Diversitätsmaß. Als Input-Parameter benötigt es durchschnittliche Verwandtschaften zwischen und innerhalb der Rassen, welche mit neutralen genetischen Markern geschätzt werden können. Mit der Verfügbarkeit von genomweiten und massiven Markerdaten ist es möglich, neben der neutralen genetischen Diversität auch die adaptive Diversität über die Kartierung von Signaturen der Selektion im Genom anzusprechen. Zukünftiger Forschungsbedarf wird in der simultanen Berücksichtigung der neutralen und der adaptiven Diversität bei der Quantifizierung der genetischen Diversität gesehen.

1. Introduction

The genetic diversity within a livestock species can be divided into the diversity that can be found within and between breeds. The within breed diversity is due to the different deviations from the respective breed mean and the between breed diversity arises from different breed means (WOOLLIAMS and TORO 2007). It is often argued that especially the between breed diversity of farm animal species is threatened by extinction of breeds. For example, there are around 7,600 breeds from 35 domestic mammals and bird species. Around one third of them are classified either as endangered, at risk or even extinct (SCHERF et al. 2006). But also the within breed diversity remains not constant over time but declines with increasing inbreeding of the breed (FALCONER and MCKAY 1996) and, of course, also because of extinction. The need to conserve genetic diversity is generally accepted (e.g. OLDENBROEK 2007). One major reason is that an abundant resource of genetic diversity is a prerequisite of coping with putative future changes in livestock farming conditions, e.g. changes in production conditions or in market requirements. Due to limited resources it is not possible to conserve all endangered breeds. Therefore, an efficient conservation scheme should include only those breeds that contribute to its objectives (SIMIANER 2005).

The need to conserve genetic diversity involves in general two questions: (i) is the expected loss of diversity in a set of breeds within a defined future time horizon large enough to establish a conservation plan, and if so (ii) which breeds should be prioritised for such a conservation plan. The present study describes a method that addresses these questions. It combines a kinship based diversity measure that considers both between and within breed diversity and a stochastic method for the estimation of expected loss of diversity and of breed marginal diversities. Putative changes in breed diversity contributions with time due to genetic drift are considered. The obtained marginal diversities can be used to assess breed conservation priorities.

2. The MVT-Diversity Measure

Assume a set of N breeds with a known average kinship matrix M . The additive genetic variance of a hypothetical quantitative trait within the set is

$$\text{var}(u_w) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(1 + M_i) - 2\bar{M}] \quad [1]$$

where M_i is the within breed kinship of breed i obtained from the diagonal elements of M and denotes the mean of all the elements of M . The maximum variance total (MVT) method forms a core set in which the total genetic variance of a hypothetical quantitative trait is maximised (BENNEWITZ and MEUWISSEN 2005a). The relative breed contributions to the MVT core set are stored in the vector c and are calculated as

$$c = \frac{1}{4} \left(M^{-1}F - \frac{1_N M^{-1}F - 4}{1_N M^{-1}1_N} \cdot M^{-1}1_N \right) \quad [2]$$

with F being a vector containing the within breed kinship, i.e. $F = \text{diag}(M)$ and 1_N a vector of ones. The MVT diversity (D) is then calculated as $D = 1 + cF - 2cMC$ (BENNEWITZ and MEUWISSEN 2005a). According to the redistribution of the variance of a quantitative

trait in subdivided populations undergoing inbreeding (FALCONER and MCKAY 1996), the MVT diversity can be partitioned into MVT between breed diversity (D_b) and MVT within breed diversity (D_w) as follows $D_b = 2(c_{mvt}F - c_{mvt}Mc_{mvt})$ and $D_w = 1 - c_{mvt}F$. Hence, $D = D_b + D_w = 2(c_{mvt}F - c_{mvt}Mc_{mvt}) + (1 - c_{mvt}F)$, which is equivalent to $D = 1 + cF - 2cMc$. Note that this diversity measure fulfils the so-called Weitzman criteria for a proper diversity measure (BENNEWITZ and MEUWISSEN 2005a).

Matrix M can be estimated using marker information (EDING and MEUWISSEN 2001, 2003). Accurate contribution estimates are obtained with bootstrapping (BENNEWITZ and MEUWISSEN 2005a), drawing B bootstrap samples. A bootstrap sample b is generated by sampling the individuals within breed and the marker loci. For each b , M is estimated by a weighted log-linear model, which uses marker estimated average similarities between and within breeds and separates IBD probabilities from Alike In State probabilities (EDING and MEUWISSEN 2003). Subsequently, the contribution vector and the diversity is estimated for each b as shown above. The final contribution vector estimate and the final diversity estimate is the mean of all bootstrap estimates, respectively.

3. Estimating Expected Future MVT-Diversity

Assume that the extinction probabilities of the breeds (z) for a defined future time horizon t (e.g. $t = 50$ years into the future) are known. The estimation of expected future diversity and breed marginal diversities can be done stochastically. A sample s is repeatedly generated from the breeds starting with the filling in of an indicator vector k . Each element k_i in k is allocated for one breed i , it is either set to zero with extinction probability z_i (breed i is extinct at time t) or to one with probability $1 - z_i$ (breed i is alive at time t). Breeds with $k_i = 0$ are removed from sample s and the diversity of s (D_s) is estimated by the MVT core set algorithm and bootstrapping as shown above, but replacing M and F in each bootstrap sample by the expected kinship matrix and expected within breed kinship vector at time t , M_t and F_t , respectively (for estimation of M_t and F_t see below). The algorithm is repeated S times. The expected diversity at t , $E(D_t)$, is the mean of all D_s and the variance of D_t , $\sigma^2_{D_t}$, is the variance of the D_s . The covariance structure of k and D_t is

$$\text{var} \begin{bmatrix} k \\ D_t \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Q & g \\ g' & \sigma^2_{D_t} \end{bmatrix}, \quad [3]$$

where Q is a matrix containing the variance of k_i (i.e. $z_i(1 - z_i)$) on the diagonal elements and zero elsewhere. Vector g contains the covariance between k_i and D_t , and can be obtained from the S samples. The marginal diversity of breed i , m_i , is defined as the change of conserved diversity at time t when the extinction probability would be changed by one unit (SIMIANER et al. 2003). Using this method, they are estimated by regressing D_t on k_i , i.e. $m_i = \text{cov}(D_t, k_i) / \text{var}(k_i)$. It was shown that this stochastic algorithm is tailored to analyse large data sets and produces accurate estimates for S being large (BENNEWITZ et al. 2006). Conservation potentials (CP) are estimated as $CP_i = z_i * m_i$ (SIMIANER et al. 2003).

Vector F_t can be modelled as a function of the rate of increase per generation of within breed kinship due to genetic drift (stored in vector ΔF) and the number of generations T (i.e. t divided by the generation interval) as follows

$$F_t = 1_N - (1_N - \Delta F)^T \circ (1_N - F) \quad [4]$$

where $\circ$ denotes for the Hadamard product. It was shown that the between breed kinship (i.e. the off diagonals in M) remains constant over time (EDING and MEUWISSEN 2001). Hence, the expected kinship matrix at time t , M_t , can be obtained by inserting the elements of F_t into the corresponding diagonal elements of M . ΔF can be obtained as one divided by two times the effective population size.

4. An Application

A data set consisting of nine cattle breeds from The Netherlands (Tab. 1) genotyped at 11 polymorphic microsatellite markers (EDING and MEUWISSEN 2003) was re-analysed with the presented algorithms ($B = 100$, $S = 10000$). The future time horizon was $t = 50$ years and the generation interval was assumed to be 5 years, hence $T = 10$. Unfortunately no data were available to estimate extinction probabilities either semi-quantitatively (REIST-MARTI et al. 2003) or quantitatively (BENNEWITZ and MEUWISSEN 2005b). Therefore, they were modelled as one divided by two time the effective population size and multiplied by a constant (i.e. by 20). Additionally, no pedigree or temporal marker data for the estimation of the effective population size were available. They were taken from the database entries of the European Association for Animal Production (<http://www.tiho-hannover.de/einricht/zucht/eaap/index.htm>).

Tab. 1 Extinction probability (z_i), within breed kinship (f_i), overall mean kinship ($f_{\text{mean},i}$), expected within breed kinship at t ($f_{t,i}$), relative contribution to the MVT diversity (c_i), marginal diversity (m_i) and conservation potential (CP_i) of the breeds

Breed	z_i	$f_i^{[1]}$	$f_{\text{mean},i}^{[1]}$	$f_{t,i}^{[1]}$	c_i	$m_i^{[2]}$	CP_i
Belgian Blue	0.027	0.117	0.068	0.121	0.042	11.14	0.301
Dutch Red Pied	0.147	0.098	0.057	0.130	0.098	34.17	5.023
Dutch Black Belted	0.065	0.200	0.088	0.213	0.087	32.22	2.094
Limousine	0.025	0.091	0.042	0.097	0.240	154.74	3.869
Holstein Friesian	0.001	0.114	0.054	0.115	0.205	23.61	0.024
Galloway	0.435	0.216	0.072	0.297	0.163	190.48	82.859
Dutch Friesian	0.034	0.115	0.069	0.122	0.023	5.82	0.198
Improved Red Pied	0.090	0.185	0.077	0.204	0.099	41.77	3.759

[1] average from all bootstrap samples

[2] multiplied by 10^4

5. Results and Discussion

The attractiveness of the MVT diversity measure is that it favours breeds with a high within breed kinship that are not related to other breeds. This can be demonstrated by the high contributions of the Limousine, Holstein Friesian and Galloway breed (Tab. 1). Consequently it attempts to conserve breeds with a large difference in the respective population mean of a hypothetical quantitative trait, which enables a strong selection among the conserved breeds for a desired trait. For prioritising breeds for conservation it seems to be advisable to use

marginal diversities or conservation potentials, because, in contrast to the relative breed contributions, they consider the extinction dynamic of the breeds.

In previous studies it was assumed that the breed diversity contribution remains constant over time if the breed is alive or drops to zero if the breed is extinct (e.g. SIMIANER et al. 2003, BENNEWITZ et al. 2006). The present study presents a way how to model a putative change of the breed contributions over time by considering the effect of genetic drift. The actual MVT diversity is 1.028 and the expected diversity at time t is 1.033. The reason for this somewhat surprising outcome (gain in diversity over time) is that most breeds are not endangered (Tab. 1) and the increase of the within breed kinship over time overcomes the loss of diversity due to putative extinction of breeds. Highest increases in within breed kinship were observed for the two breeds with lowest effective population size, Galloway and Dutch Red Pied (Tab. 1). Without considering the effect of drift, the marginal diversities of especially these two breeds changed markedly (dropped to 110.45 and 20.11, respectively, compare with Tab. 1). This shows that the effect of considering drift is highest for those breeds with a low effective population size which are usually the most endangered breeds and, therefore, their marginal diversity are of particular interest. Additionally, not considering drift would result in a reduced estimate for the expected future diversity at time t (1.022).

6. Conclusion and the Future

The MVT diversity measure values breeds with high within breed kinship that are not related to other breeds in order to maximise the total variability of putative traits. Marginal diversities are suitable measures to prioritise breeds for conservation. They can be estimated for large data sets using the presented stochastic algorithm. Considering future drift increases the marginal diversity of endangered breeds, because their effective size is small and thus expected future drift is the largest.

In future it is expected that next to the neutral MVT-diversity also adaptive diversity will become important in making decision about the genetic value of a breed for conservation. This is because with the advent of massive molecular marker data it is possible to find chromosomal regions that contain genes which are responsible for the adaptation of a breed to its environment.

References

- BENNEWITZ, J., and MEUWISSEN, T. H. E.: A novel method for the estimation of the relative importance of breeds in order to conserve the total genetic variance. *Genet. Sel. Evol.* 37, 315–337 (2005a)
- BENNEWITZ, J., and MEUWISSEN, T. H. E.: Estimation of extinction probabilities of five German cattle breeds by population viability analysis. *J. Dairy Sci.* 88, 2949–2961 (2005b)
- BENNEWITZ, J., KANTANEN, J., TAPIO, I., LI, M. H., KALM, E., VILKKI, J., AMMOV, I., IVANOVA, Z., KISELYOVA, T., POPOV, R., and MEUWISSEN, T. H. E.: Estimation of breed contributions to present and future genetic diversity of 44 North Eurasian cattle breeds using core set diversity measures. *Genet. Sel. Evol.* 38, 201–220 (2006)
- EDING, H., and MEUWISSEN, T. H. E.: Marker based estimates of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity. *J. Anim. Breed. Genet.* 118, 141–159 (2001)
- EDING, H., and MEUWISSEN, T. H. E.: Linear methods to estimate kinships from genetic marker data for the construction of core sets in genetic conservation schemes. *J. Anim. Breed. Genet.* 120, 289–302 (2003)
- FALCONER, D. S., and MACKEY, T. F. C.: *Introduction to Quantitative Genetics*. London: Longman 1996

- OLDENBROEK, K. (Ed.): Utilisation and Conservation of Farm Animal Genetic Resources. Wageningen (The Netherlands): Wageningen Academic Publishers 2007
- REIST-MARTI, S. B., SIMIANER, H., GIBSON, J., HANOTTE, O., and REGE, J. E. O.: Analysis of the actual and expected future diversity of African cattle breeds using the Weizman approach. *Conserv. Biol.* 17, 1299–1311 (2003)
- SCHERF, B., RISCHKOWSKY, B., PILLING, D., and HOFFMANN, I.: The state of the world's animal genetic resources. Proc. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, CD-Rom Communication No. 33–13 (2006)
- SIMIANER, H., REIST-MARTI, S. B., GIBSON, J., HANOTTE, O., and REGE, J. E. O.: An approach to the optimal allocation of conservation funds to minimize loss of genetic diversity between livestock breeds. *Ecol. Econ.* 45, 377–392 (2003)
- SIMIANER, H.: Decision making in livestock conservation. *Ecol. Econ.* 54, 559–572 (2005)
- WOOLLIAMS, J., and TORO, M.: What is genetic diversity? In: OLDENBROEK, K. (Ed.): Utilisation and Conservation of Farm Animal Genetic Resources; pp. 55–74. Wageningen (The Netherlands): Wageningen Academic Publishers 2007

Prof. Dr. Jörn BENNEWITZ
Institut für Tierhaltung und Tierzüchtung
Universität Hohenheim
Garbenstraße 17
Instituts- und Hörsaalgebäude 110
70593 Stuttgart
Germany
Phone: +49 711 45923570
Fax: +49 711 45923101
E-Mail: j.bennewitz@uni-hohenheim.de

II. Genanalysen bei Haustieren

SNP-Hochdurchsatzanalysen zur Genkartierung

Ivica MEDJUGORAC (München)

Mit 6 Abbildungen und 1 Tabelle

Zusammenfassung

Die Genome der domestizierten Nutztiere enthalten Hunderte von Regionen, deren Variabilitätsprofil eine kürzliche positive natürliche und/oder künstliche Selektion andeutet. Die meisten zugrunde liegenden Gene und vorteilhaften Mutationen sind nach wie vor unbekannt. Wir verwenden und entwickeln Designs und Methoden, die verschiedene Analysen der positiven Selektion miteinander kombinieren und so zu einer feineren Resolution der Kartierung führen. Unter Verwendung von SNP-Hochdurchsatzanalysen lokalisierten wir Erbkrankheiten, *Quantitative Trait Loci* sowie bekannte und neue populationspezifische Selektionssignale beim Rind. Die Anwendung des Versuchsdesigns auf mehrere divergent- und unselektierte Rinderrassen soll eine Identifizierung der kausalen Varianten erleichtern. Obwohl der derzeit verfügbare (50K) SNP-Chip eine enorme Beschleunigung der Genkartierung darstellt, ist eine Kartierung unter einer Megabase weiterhin selten. Die hier diskutierten vorläufigen Ergebnisse demonstrieren, dass eine Entwicklung eines größeren SNP-Chips ohne Erhebungsverzerrung notwendig ist, um eine noch schnellere und präzisere Identifizierung von einzelnen kausalen Loci zu ermöglichen.

Abstract

The genomes of domesticated animals contain hundreds of regions whose variability profiles indicate a recent positive natural and/or artificial selection. Most of the underlying genes and advantageous mutations are still unknown. We are using and developing designs and methods, which combine different analyses of positive selection and thus enable a finer resolution of the mapping. Based on high-throughput analyses we localised hereditary diseases, quantitative trait loci and already published as well as unpublished population specific selection signals in cattle. The application of the study design in several divergent and unselected cattle breeds shall facilitate the identification of the causal variants. Although the currently available (50K) SNP-Chip represents an enormous acceleration in gene mapping, fine mapping below one mega base still remains rare. The discussion of the present preliminary results demonstrates the need of the development of a larger SNP-Chip without ascertainment bias to enable a faster and more precise identification of single causal loci.

1. Einleitung

Der größte Teil der phänotypischen Varianz innerhalb einer Spezies scheint durch zahlreiche Gene kontrolliert zu sein. Solche Gene mit quantitativem Effekt (*Quantitative Trait Loci* – QTL) sind deutlich schwieriger zu identifizieren als Mendelschen Merkmalen zugrunde liegende Gene. Die Methode der Intervallkartierung (LANDER und BOTSTEIN 1989) und deren Varianten (reviewed in MANLY und OLSON 1999, BROMAN 2001) wurden intensiv zur Kartierung von QTLs genutzt, detektieren aber derart große Genomregionen, die kaum eine Identifizierung der beteiligten Gene erlauben. Da neben anderem die Feinkartierung von QTLs

eine große Zahl an informativen Rekombinationsereignissen benötigt, wurden verschiedene Strategien zur Anhebung von Rekombinationsereignissen in der Kartierungspopulation vorgeschlagen (DARVASI 1998, 2005, RONIN et al. 2003, JIN et al. 2004, XU et al. 2005). Ein weiterer Nachteil der klassischen Kartierungsmethoden ist, dass sie nur in Populationen mit einer etablierten Merkmalerfassung, und zwar nur für explizit erfasste Merkmale, anwendbar sind.

Eine neue Entwicklung in der Molekulargenetik erlaubt die Anwendung von sogenannten „Population genomics“ (z. B. JORDE et al. 2001) auch in der Tierzucht. Die Entwicklung der SNP-Chip-Technologie ermöglicht genomweite Genotypisierungen (z. B. DUERR et al. 2006, BARENDSE et al. 2007) bei Hunderten von Individuen mit vertretbarem Kostenaufwand. Die Entwicklung von ausgeklügelten analytischen Methoden (VOIGHT et al. 2006, TISHKOFF et al. 2007, SABETI et al. 2007, PICKRELL et al. 2009, GROSSMAN et al. 2010) führt zu einer sehr feinen Kartierung von Genen unter adaptiver oder künstlicher Selektion. Andererseits wurden hoch effektive SNP-basierte Assoziationsanalysen in Fall-Kontroll-Studien (Case-Control Design, CCD) zur Kartierung von monogenen Krankheiten entwickelt (CHARLIER et al. 2008). Diese Kartierungsmethoden nutzen alle historischen Rekombinationsereignisse und erlauben gleichzeitig auch eine Kartierung ohne explizite Merkmalerfassung in Teilpopulationen. Somit werden die schwerwiegenden oben genannten Nachteile der klassischen Kartierungsmethoden umgangen. Darüber hinaus werden durch die Kartierung von Genen unter adaptiver oder künstlicher Selektion gerade Gene, die die effektive genetische Vielfalt repräsentieren, identifiziert. Dies sind nicht nur Gene, die die Leistung und Produktqualität bei Nutztierassen beeinflussen, sondern auch Gene, die allgemein eine Rasse oder Teilpopulation von anderen unterscheiden.

Die Identifikation von Genen, die eine effektive genetische Vielfalt repräsentieren, kann die Studien der genetischen Vielfalt bei domestizierten Tierarten aus einem theoretischen in einen anwendungsbezogenen und kommerziellen Wirkungsbereich verschieben.

Aus laufenden und vorangegangenen Kartierungs- und Diversitätsstudien standen uns umfangreiche Probensammlungen zur Verfügung, die zum größten Teil bereits mit zahlreichen Mikrosatellitenmarkern genotypisiert wurden. Dadurch wurden wichtige Vorkenntnisse über Populationsunterteilung sowie eine grobe Kartierung von Genen gewonnen. Aus diesem Material und den Vorkenntnissen wurde ein klassisches CCD zur Kartierung von monogenen Krankheiten angewendet und ein neues reziprokes CCD (R-CCD, Reciprocal-Case-Control Design) zur Kartierung von adaptiver Diversität entwickelt. Es wurden zuerst anhand klassischer CCD am Beispiel von zwei Erbkrankheiten die Effizienz und die Grenzen der zurzeit verfügbaren SNP-Hochdurchsatzanalysen demonstriert. Darauf folgend wurde ein R-CCD zur Kartierung von adaptiver Diversität in zehn divergent selektierten Rinderrassen eingesetzt. Die hier angewendeten Methoden und erzielten Ergebnisse sollen eine Diskussion über unsere Erwartungen von SNP-Hochdurchsatzanalysen anregen.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere für Klassische Fall-Kontroll-Studie – Spinale Dysmyelinisierung und Arachnomelie

Die *Bovine Spinale Dysmyelinisierung* (BSD) ist eine monogene rezessive Erbkrankheit, die zu tödlichen Myelinisierungsstörungen neugeborener Kälber der Rasse Braunvieh (BV) führt. In der vorliegenden Studie wurden als Fallgruppe 19 BV-Kälber genommen, die als Merk-

malsträger durch klinische und neurologische Untersuchungen an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München diagnostiziert wurden. Als Kontrollgruppe diente eine Stichprobe von 44 möglichst unverwandten Originalen Braunvieh (OBV)-Tieren. Da BSD durch Amerikanische *Brown-Swiss* (BS)-Bullen in die europäische BV-Population eingeführt wurde, wurde auch eine Stichprobe von 43 möglichst unverwandten Braunvieh-*Brown-Swiss* (BBV)-Tieren als zweite Kontrollgruppe analysiert. Neben Fall- und Kontrollgruppen wurden 21 Anlageträger analysiert.

Die *Spinnengliedrigkeit* (SAA, Syndrom der Arachnomelie und Arthrogrypose) ist eine erbliche Entwicklungsstörung, die beim Fleckvieh und Braunvieh zu totgeborenen Kälbern mit Missbildungen führt. SAA wird in beiden Rinderrassen monogen autosomal rezessiv vererbt, präsentiert aber eine Krankheit mit Locus-Heterogenität, d. h., die gleiche Krankheit wird durch verschiedene Gene in Fleckvieh und Braunvieh hervorgerufen (DRÖGEMÜLLER et al. 2009, BUITKAMP et al. 2009). Als Fallgruppe dienten 12 Fleckvieh-Kälber, die als *spinnengliedrig* diagnostiziert wurden. Die mit SNP genotypisierten Merkmalsträger wurden anhand vorangegangener Mikrosatellitenanalyse zur Kartierung und markergestützten Selektion in der Tierzuchtforchung e. V. München (TZF) ausgesucht, die DNA präpariert und mit Bead-Chip (BovineSNP50) der Firma Illumina genotypisiert. Aus etwa 100 verfügbaren Merkmalsträgern wurden nur solche, die möglichst einen rekombinanten Haplotyp tragen, ausgewählt. Die Kontrollgruppe bestand aus 50 möglichst unverwandten reinrassigen Fleckvieh (DFV, ohne Einkreuzung von Rot-Bunten [RH])-Tieren. Neben Fall- und Kontrollgruppen wurden sieben Anlageträger analysiert.

2.2 Tiere für reziproke Fall-Kontroll-Studie zur Kartierung von adaptiver Diversität

Die zehn in Tabelle 1 dargestellten Teilpopulationen wurden bereits mittels Mikrosatellitenmarker umfangreich analysiert (MEDUGORAC et al. 2009) und für eine genomweite Geno- und Haplotypisierung mit BovineSNP50-Chip ausgewählt. Diese Teilpopulationen repräsentieren vier Selektionsrichtungen (Unselektiert, Doppelnutzung, Milchnutzung und Fleischnutzung) mit breiter geografischer Deckung von Anatolien über Balkan und Alpen zur europäischen Nordküste und Schottland.

Alle in Tabelle 1 genannten Tiere wurden als typische Vertreter der jeweiligen Rasse und möglichst unverwandt ausgewählt. Dabei wurden schriftliche und mündlich von Züchtern mitgeteilte Informationen berücksichtigt. Einige Stichproben wurden in unserem Auftrag durch entsprechende Zuchtverbände gesammelt.

2.3 Gen- und Haplotypisierung

Für oben genannte Tiere standen Proben aus Blut, Sperma und Haarwurzeln zur Verfügung. Entsprechend der Probenart wurde DNA nach Standardprotokollen präpariert und zur Genotypisierung mit SNP-Chip BovineSNP50 der Firma Illumina an die TZF weitergereicht. Von der TZF erhaltene Genotypen wurden in eine MS SQL-Server-Datenbank an unserem Lehrstuhl importiert und mit Datenbankanwendungen auf Plausibilität kontrolliert. Diese Kontrolle bestand aus Tier- und Marker-bezogener Call-Rate (Erfolgsquote der Genotypisierung pro Tier und/oder pro Marker) sowie aus einem Abstammungstest (wo möglich). Anschließend wurde eine genomweite Haplotypisierung mit dem Programm BEAGLE (Version 3.0.4, BROWNING and BROWNING 2009) durchgeführt. Eine genomweite IBD-Analyse (IBD, Wahrscheinlichkeit

Tab. 1 Die zehn für eine Selektionssignaturanalyse ausgewählten Rinderrassen

Nr.	Teilpopulation Abk.	Name	Herkunft und Selektion	Kurze Beschreibung/Begründung	N
1	ASV	Anatolisches Schwarzbild	Anatolien / keine Zuchtprogramme	Autochthones, einfarbiges, kurzhorniges, Kleinrahmiges Dreinutzungsind.	49
2	ILR	Illyrisches Rind	Albanien / keine Zuchtprogramme	Autochthones, einfarbiges, kurzhorniges, kleinrahmiges Dreinutzungsind.	45
3	DFV	Fleckvieh	Deutschland / Milch und Fleisch	Zweifarbige mittel- bis großrahmige Doppelnutzungsind aus Alpenregion.	48
4	MWF	Murnau- Werdenfelser	Bayern / Milch und Fleisch	Mittelrahmige einfarbige Doppelnutzungsind aus Alpenregion.	50
5	FGV	Gelbvieh	Bayern / Milch und Fleisch	Mittelrahmige einfarbige Doppelnutzungsind aus Franken.	50
6	OBV	Original Braunvieh	Deutschland und Schweiz/ Milch und Fleisch	Mittelrahmige einfarbige Doppelnutzungsind aus Alpenregion.	48
7	BBV	Braunvieh – Brown-Swiss	Deutschland und weltweit / Milch	Auf OBV-Basis für hohe Milchleistung selektiertes Rind	48
8	RH	Red-Holstein	Deutschland und weltweit / Milch	Für hohe Milchleistung auf Rot- Buntbasis selektiertes großrahmiges Holsteinind	50
	BBB	Weißblaue Belgier	Belgien und weltweit / Fleisch	Mittel- bis großrahmig, extrem bemuskeltes Rind.	48
10	GLW	Galloway	Deutschland und weltweit / Fleisch	Extensives, kleines, robustes, für Fleischproduktion selektiertes Rind.	46

der Herkunftsgleichheit) wurde mit dem Programm PLINK (PURCELL et al. 2007) durchgeführt und uns unbekannte Verwandtschaften überprüft. Alle Tiere mit einem genomweiten IBD > 0,2 (ausgenommen Fallgruppe in CCD) wurden aus weiteren Analysen ausgeschlossen.

2.4 Populationsunterteilung F_{ST} -Wert

Der F_{ST} -Wert (WEIR und COCKERHAM 1984) ist ein klassischer Parameter zur Schätzung der Populationsunterteilung und wurde lange Zeit zur Aufdeckung von Ausreißern bzw. selektierten Loci verwendet. GROSSMAN et al. (2010) demonstrierten, dass der F_{ST} -Wert in Kombination mit anderen Selektionssignalen zur Verbesserung der Kartierung führen kann. Hier wurden genomweit F_{ST} -Werte für alle Populationspaare nach WEIR und COCKERHAM (1984) mittels einer Datenbank und *Visual-Basic*-Anwendung berechnet.

2.5 Genomweite Homozygotie-Kartierung

Eine genomweite Homozygotie-Kartierung wurde mit der Methode ASSHOM (CHARLIER et al. 2008) durchgeführt. Diese Kartierung sucht in einer Stichprobe nach gemeinsamen homozygoten Segmenten, die nicht unbedingt herkunftsgleich sind. Diese nicht parametrische Methode führt nur zu einem Treffer, wenn sich die Homozygotie über lange Segmente vom

jeweiligen Chromosomenpaar in der ganzen Fallgruppe erstreckt. Wir implementierten diese Methode in eine *Visual-Basic*-Anwendung, die durch MS-SQL-Server unterstützt wird.

Die Homozygotie-Kartierung wurde zuerst für die Kartierung von monogenen rezessiven Erbkrankheiten (Abschnitt 2.1) angewendet. Dabei wurde jeweils nur eine Fall- und eine bzw. zwei Kontrollgruppen berücksichtigt. In einer zweiten Phase wurde dieses Verfahren zur Kartierung von rassenspezifischen Homozygotie-Regionen angepasst. Dabei wurden zehn Rinderrassen gegenseitig verglichen. Jede Rasse wurde als Fallgruppe gegen neun Kontrollgruppen genomweit verglichen. Somit wird in einem Vergleich BBV-DFV-Selektion nur in Fallgruppe BBV, und im Vergleich DFV-BBV-Selektion nur in Fallgruppe DFV entdeckt. Wir nennen dies reziproke Fall-Kontroll-Analyse oder reziprokes Fall-Kontroll-Design (R-CCD, Reciprocal-Case-Control Design).

2.6 Cross Population Extended Haplotype Homozygoty

Die *Extended Haplotype Homozygoty* (EHH) ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig ausgewählte Chromosomen, die den gleichen Haplotyp von Interesse tragen, herkunftsgleich sind (SABETI et al. 2002). Dadurch deckt EHH die Übertragung von langen Haplotypen ohne Rekombination auf. Die EHH-Werte dienen als wichtigster Inputparameter für die Durchführung von *Long Range Haplotype* (LRH)-, *integrated Haplotype Score* (iHS)- und *Cross Population EHH* (XP-EHH)-Tests. Mit diesen Tests werden Signale der positiven Selektion kartiert und die Teilpopulation(en), die unter Selektion für bestimmte Gene bzw. Chromosomenregionen steht/steht, detektiert. Für das hier gewählte Versuchsdesign mit vier Selektionsrichtungen in zehn Teilpopulationen mit verschiedener geografischer Herkunft schätzen wir XP-EHH-Tests als ein besonders attraktives Verfahren (SABETI et al. 2007, PICKRELL et al. 2009, GROSSMAN et al. 2010) ein. Ein wesentlicher Unterschied zwischen XP-EHH- und iHS-Test für ein Design mit divergent selektierten Teilpopulationen ist, dass XP-EHH auch in einzelnen Teilpopulationen fixierte Allele zur Erkennung von Selektionssignalen nutzen kann. Daher werden hiermit die wichtigsten rassenspezifischen Allele detektiert. Ein wesentlicher Unterschied zwischen XP-EHH und R-CCD-Test ist, dass R-CCD nur Regionen aufdeckt, die in einer Rasse komplett fixiert sind, und XP-EHH darüber hinaus noch streng selektierte, aber noch nicht fixierte Allele kartieren kann. Daher werden hiermit die wichtigsten positiv selektierten und rassenspezifischen Allele detektiert.

Hier wurden genomweite XP-EHH-Analysen mit dem Programm xpehh von PICKRELL et al. (2009) durchgeführt. Als Input-Daten wurden die Ergebnisse der Haplotypen- und Imputation-Analyse nach BROWNING und BROWNING (2009) verwendet. Die erhaltenen ungewichteten XP-EHH-Werte wurden in eine Datenbank importiert und für jeden Rassenvergleich getrennt standardisiert. Standardisierte XP-EHH-Werte wurden durch Datenbankanwendungen für grafische Darstellungen und weitere Analysen entsprechend vorbereitet.

3. Ergebnisse

3.1 Klassische Fall-Kontroll-Studie

Von 19 Merkmalsträgern für *Bovine Spinale Dysmyelinisierung* (BSD) wurden 16 erfolgreich genotypisiert. Drei DNA-Proben, gesammelt 1995, waren stark degradiert und wurden

mit einer nicht zufriedenstellenden *Call Rate* ($0,82 < \text{Call Rate} < 0,95$) genotypisiert. Die verbliebenen 16 Merkmalsträger (*Call Rate* $> 0,98$) führten zu einer BSD-Kartierung auf *Bos taurus*-Autosom 11 (BTA11). Die Abbildung 1A zeigt, dass beide, OBV und BBV als Kontrollgruppe, zur gleichen Kartierung führen. Die Nutzung von OBV als Kontrollgruppe führt zu einem stärkeren Signal als BBV, jedoch führen beide nur zu einer Resolution von 2,914 Mb. Der in allen Merkmalsträgern homozygote Block erstreckt sich von 13838010 bis 16752108 bp, in dessen Mitte (von 15334113 bis 15389187, siehe Abb. 1) sich das BSD kausale Gen *SPAST* (THOMSEN et al. 2010) befindet.

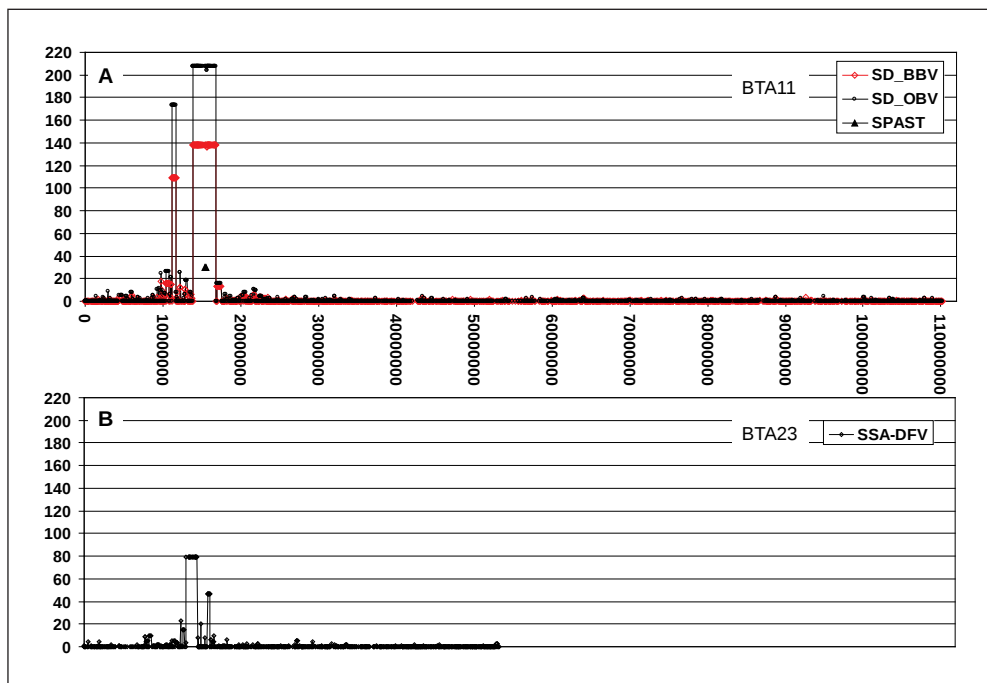


Abb. 1 Ergebnisse der klassischen Fall-Kontroll-Kartierung für zwei Erbkrankheiten. Auf der X-Achse ist die physikalische Position einzelner Marker in Basenpaaren (bp) dargestellt. Die Y-Achse präsentiert den unstandardisierten ASSHOM-Wert, berechnet nach CHARLIER et al. (2008). (A) Homozygotie-Kartierung von *Boviner Spinaler Dysmyelinisierung* (BSD) auf BTA11 unter Nutzung von Original Braunvieh (OBV) und Brown-Swiss-Braunvieh (BBV) als Kontrollgruppe. Die Position des BSD-kausalen Gens *SPAST* (THOMSEN et al. 2010) ist mit einem Dreieck gekennzeichnet. (B) Homozygotie-Kartierung von *Spinnengliedrigkeit oder Arachnomelie* (SAA) auf BTA23 in der Fleckvieh-Population (DFV). Beide Abbildungsteile A und B wurden für X- und Y-Achse auf die gleiche Skala gebracht.

Alle 12 ausgewählten SAA-Merkmalsträger und 50 unverwandte Kontrolltiere wurden mit einer hohen *Call Rate* ($> 0,97$) genotypisiert. Das hier erzielte Ergebnis (Abb. 1B) bestätigt die Kartierung von SAA auf BTA23 in der Fleckvieh-Population (BUTKAM et al. 2009). Beide Abbildungen 1A und 1B wurden für X- und Y-Achse auf die gleiche Skala gebracht. Somit wird aus dem direkten Vergleich ersichtlich, dass die 12 SAA-Merkmalsträger zu einer zweimal genaueren Kartierung (1,461 Mb) führen als 16 BSD-Merkmalsträger.

3.2 Genomweite IBD und Populationsunterteilung

Die genomweite IBD spiegelt die realisierte Verwandtschaft zwischen einzelnen Tieren wider. Obwohl jede Anstrengung unternommen wurde, relativ unverwandte Tiere für jede Rasse aus Tabelle 1 zu sammeln, wurden in allen Teilpopulationen Tierpaare mit hoher realisierter Verwandtschaft gefunden. Aus jedem dieser Paare wurde das Tier mit der niedrigeren *Call Rate* aus weiteren Selektionssignaturanalysen entfernt. Dieses Prozedere wurde wiederholt, bis alle Tierpaare eine genomweite IBD $< 0,2$ zeigten. Dies führte zu einer deutlichen Reduzierung der Stichprobengröße in einzelnen Populationen (Abb. 2). So wurde z. B. die MWF-Stichprobe von 50 (Tab. 1) auf 23 (Abb. 2) reduziert. Durch eine detaillierte Analyse der realisierten Verwandtschaften wurde neben der im Voraus bekannten Unterteilung von OBV in Schweizer und deutsche Teilpopulation auch eine Unterteilung von GLW in Belted und Schwarze sowie eine Unterteilung von BBB in belgische und dänische Teilpopulationen entdeckt. Da diese Stichproben in unserem Auftrag durch Zuchtverbände gesammelt wurden, spricht dieses Ergebnis für eine präzise Zuordnung einzelner Individuen zu Teilpopulationen und weniger für eine präzise Zusammenstellung der Stichproben. Die F_{ST} -Werte wurden für alle 47 003 Marker berechnet, die die Plausibilitätskontrolle bestanden und eine minimale Variabilität gezeigt hatten. Anhand des gleichen Markersatzes wurden auch paarweise F_{ST} -Werte zwischen den 14 Teilpopulationen berechnet (Abb. 2). Eine 100%ige Zuverlässigkeit dieser Gruppierung wurde durch 10 000 Bootstrap-Replikate bestätigt. Da eine Populationsstratifizierung in diversen Kartierungsdiseins zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann (LANDER und SCHORK 1994), wurden vorerst nur größere Teilpopulationen der gleichen Rasse für Selektionssignaturanalysen verwendet, d. h. Schwarze Galloways, Belgische Weißblaue Belgier und Schweizer Original Braunvieh-Tiere.

Weitere Ergebnisse der F_{ST} -Analyse werden parallel in R-CCD- und XP-EHH-Analysen gezeigt.

3.3 Signale der adaptiven oder positiven künstlichen Selektion kartiert durch reziproke Fall-Kontroll-Studie zwischen Rassen

Die reziproke Fall-Kontroll-Studie (R-CCD) zwischen 10 Rinderrassen zeigte etwa drei Dutzend eindeutige Signale der adaptiven oder positiven künstlichen Selektion, die zu einer Fixierung innerhalb einzelner Rassen führte. Die gegenseitige Bestätigung der Ergebnisse wird hier an einigen ausgewählten Beispielen demonstriert.

Auf BTA01 werden höchste ASSHOM-Werte im chromosomalen Segment von 0,312 Mb (1479888-1791641) detektiert. Allerdings sind diese Signale nur in Populationspaaren zu beobachten, wo GLW als Fallgruppe dient. Das stärkste Signal ist im Vergleich von GLW-BBB zu beobachten, und weitere acht unabhängige Vergleiche bestätigen die positive Selektion in GLW. Da zwischen den zehn hier untersuchten Rinderrassen nur GLW für Hornlosigkeit selektiert wurde und in diesem Bereich das Gen für Hornlosigkeit (DRÖGEMÜLLER et al. 2005) kartiert wurde, handelt es sich um eine unabhängige Kartierung von positiv selektierter Hornlosigkeit in GLW durch R-CCD. F_{ST} -Werte auf BTA01 (besonders zwischen GLW und BBV) unterstützen die R-CCD-Ergebnisse. Diese Kartierung innerhalb 0,312 Mb ist feiner als das bislang öffentlich verfügbare Ergebnis (DRÖGEMÜLLER et al. 2005).

Ein weiteres Beispiel, das unser Vertrauen in die Ergebnisse der R-CCD-Methode stärkt, ist auf BTA02 zu finden. In einem Bereich von nur 29 Kb (6996750-7025774) detektierten

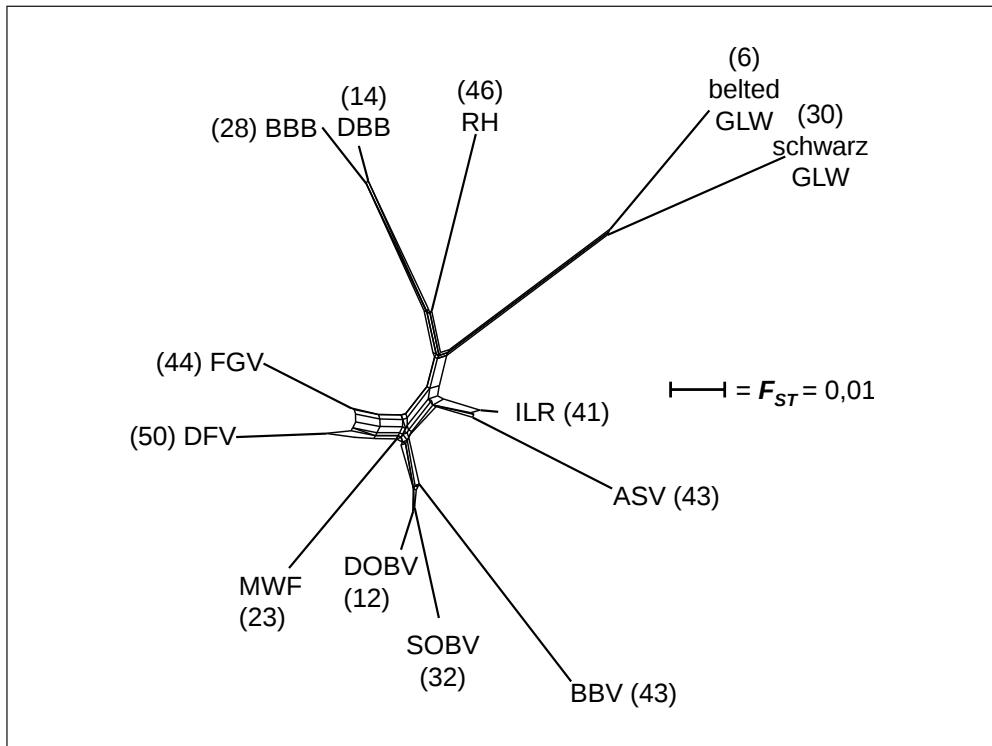


Abb. 2 *Strict Consensus Neighbour-Network* von paarweisen F_{ST} -Werten zwischen 14 Teilpopulationen. Neben der Abkürzung der Rasse bzw. Teilpopulation wurde auch die Stichprobengröße aufgeführt. Die Rassenabkürzung ist wie in Tabelle 1. Die Stichprobengröße ist hier kleiner als in Tabelle 1, da alle Tiere mit hoher realisierter Verwandtschaft ($IBD > 0,2$) von F_{ST} -Schätzung und Selektionssignaturanalysen ausgeschlossen wurden.

wir nur ein Selektionssignal, wenn BBB als Fallgruppe diene. Dieses chromosomale Segment, bezeichnet durch lange überlappende Homozygotie-Bereiche in BBB, liegt in unmittelbarer Nähe zu Myostatin, das als Doppellender-Gen in BBB bekannt ist (GROBET et al. 1997). Dieses höchste R-CCD-Signal auf BTA02 wird durch ebenfalls höchste F_{ST} -Werte (0,70–0,96) zwischen BBB und 9 Vergleichsrassen unterstützt.

Weitere Beispiele von erfolgreicher Kartierung der Selektionssignale werden entlang der Ergebnisse der XP-EHH-Analyse dargestellt.

3.4 Signale der positiven Selektion kartiert durch XP-EHH

Beide oben beschriebene Kartierungsbeispiele sind auch durch XP-EHH bestätigt. Um eine gegenseitige Unterstützung der Ergebnisse zu demonstrieren, wird hier ein positiv selektiertes Segment auf BTA11 dargestellt.

Auf BTA11 im Bereich von etwa 66,1 bis 73,5 Mb detektierten wir stark angehäufte und überlange Haplotypen in OBV im Vergleich mit 8 weiteren Rinderrassen. Die einzige Ausnahme bildete BBV (aus OBV abgeleitet). Im Kernbereich von 69 bis 70 Mb wurden standardisierte XP-EHH-Werte erreicht, die um 8 bis 11 Standardabweichungen (SD) vom

genomweit durchschnittlichen XP-EHH-Wert größer sind (Abb. 3). Im gleichen Bereich zeigt nur noch BBV Signale der positiven Selektion, insbesondere im Vergleich mit unselektiertem ASV. Obwohl dies ein deutlich schwächeres Signal ist, werden immerhin Werte von 5,25 SD erreicht. Die R-CCD-Analyse zeigte ebenfalls, dass nur OBV eine vollständige Fixierung für 16 benachbarte Marker und eine weiträumige überlappende Homozygotie in der angrenzenden Region aufwies (Abb. 3). F_{ST} -Werte $> 0,70$ sind für zahlreiche SNP-Marker in diesem Kernabschnitt von 0,633 MB und Umgebung zu finden (Abb. 3).

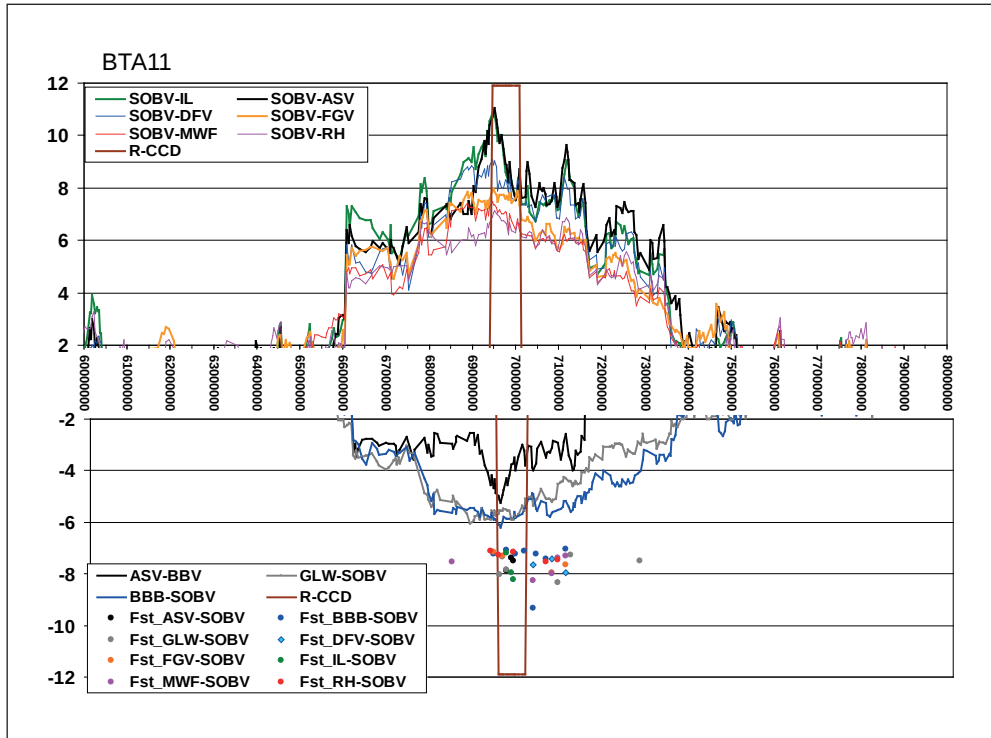


Abb. 3 XP-EHH-Kartierung von positiver Selektion in Schweizer Original Braunvieh (SOBV) auf BTA11. Auf der X-Achse ist die physikalische Position einzelner Marker in Basenpaaren (bp) dargestellt. Die Y-Achse präsentiert den standardisierten XP-EHH-Wert mit Mittelwert 0 und Standardabweichung 1, berechnet nach SABETI et al. (2007). Negative XP-EHH-Werte deuten eine Selektion in der zweiten Vergleichsrasse an. Ergebnis der R-CCD-Analyse sowie geschätzte F_{ST} -Werte ($F_{ST}^*(-10)$) wurden eingeblendet.

In Abbildung 4 sind die massiven Unterschiede in der Haplotypenlänge in OBV verglichen mit DFV, RH und BBB in dieser Region unter positiver Selektion gezeigt.

Auf BTA06 befinden sich in zwei verschiedenen Rassen zwei verschiedene Regionen unter Selektionsdruck. In der Region von 37,5 bis 39 Mb ist BBV bis zur weiträumigen Fixierung selektiert (Abb. 5A). Andererseits ist eine Region von 71,5 bis 73,5 Mb stark in DFV selektiert (Abb. 5B). Allerdings ist diese Region nur in einem relativ kurzen Bereich (0,24 Mb) fixiert oder nahe an einer Fixierung. In der Abbildung 5A und 5B sind sich gegenseitig unterstützende Ergebnisse von R-CCD, populationspezifische EHH und F_{ST} -Analysen dargestellt.

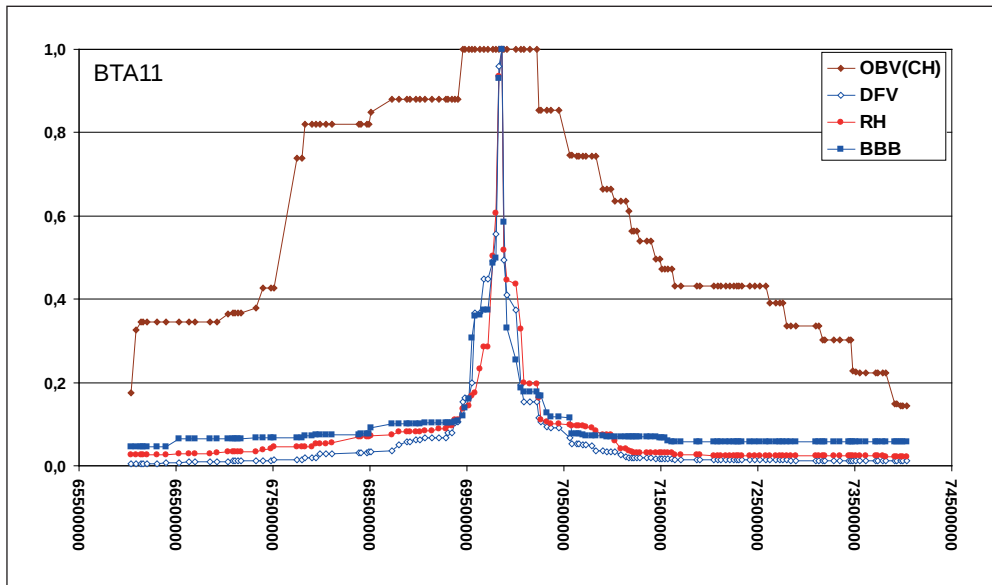


Abb. 4 EHH-Werte als Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig ausgewählte Chromosomen, die den gleichen Haplotyp von Interesse tragen, herkunftsgleich sind in zwei Rinderrassen auf BTA11. Auf der X-Achse ist die physikalische Position einzelner Marker in Basenpaaren (bp) dargestellt. Die Y-Achse präsentiert rassenspezifische EHH-Werte. Positive Selektion und lange Region mit kompletter Fixierung ($EHH = 1$) in Schweizer Original Braunvieh (SOBV), verglichen mit Fleckvieh (DFV), Red-Holstein (RH) und Weißblaue Belgier (BBB), sind aus der Verteilung der EHH-Werte ersichtlich.

Ein letztes hier aufgeführtes Beispiel liefert BTA05 mit dem Abschnitt von 81,7 bis 82,5 Mb. Hier ist ein starker Selektionsdruck in BBV im Vergleich zu anderen Rassen zu beobachten. Insbesondere zwischen BBV und DFV ist ein starker Unterschied zu beobachten (Abb. 6). Während BBV für eine zentrale Region von 8 Markern bis zur Fixierung selektiert wurde und lange Haplotypen um dieses Segment aufweist, zeigt DFV ganz normale Heterozygotiegrade von über 0,3 und für eine nicht selektierte Region typische, kurze Haplotypen. Die in BBV fixierte Region von etwa 0,24 Mb beinhaltet, soweit uns bekannt, nur ein Gen, Synaptotagmin-10 (SYT10). Es wurden 7 Primerpaare, die 7 SYT10-Exons flankieren, synthetisiert und in jeweils einem BBV- und DFV-Tier vorwärts und rückwärts sequenziert. Es ergab sich eine Sequenz von insgesamt 5953 bp in hoher Qualität. In dieser Sequenz waren vier Unterschiede zwischen BBV und DFV zu finden, allerdings befinden sich alle diese Unterschiede in Introns und konnten nicht als ursächlich für die präsenzte Selektion deklariert werden.

4. Diskussion

Es stehen zahlreiche Methoden zur Kartierung von wichtigen Genen in den Nutztierassen zur Verfügung. Die meisten dieser Methoden wurden in der Humangenetik entwickelt und für spezifische Probleme und Designs in der Tierzucht adaptiert. Dies begann mit der Intervallkartierung (LANDER und BOTSTEIN 1989) und setzt sich mit der aktuellen Selektionssignatur

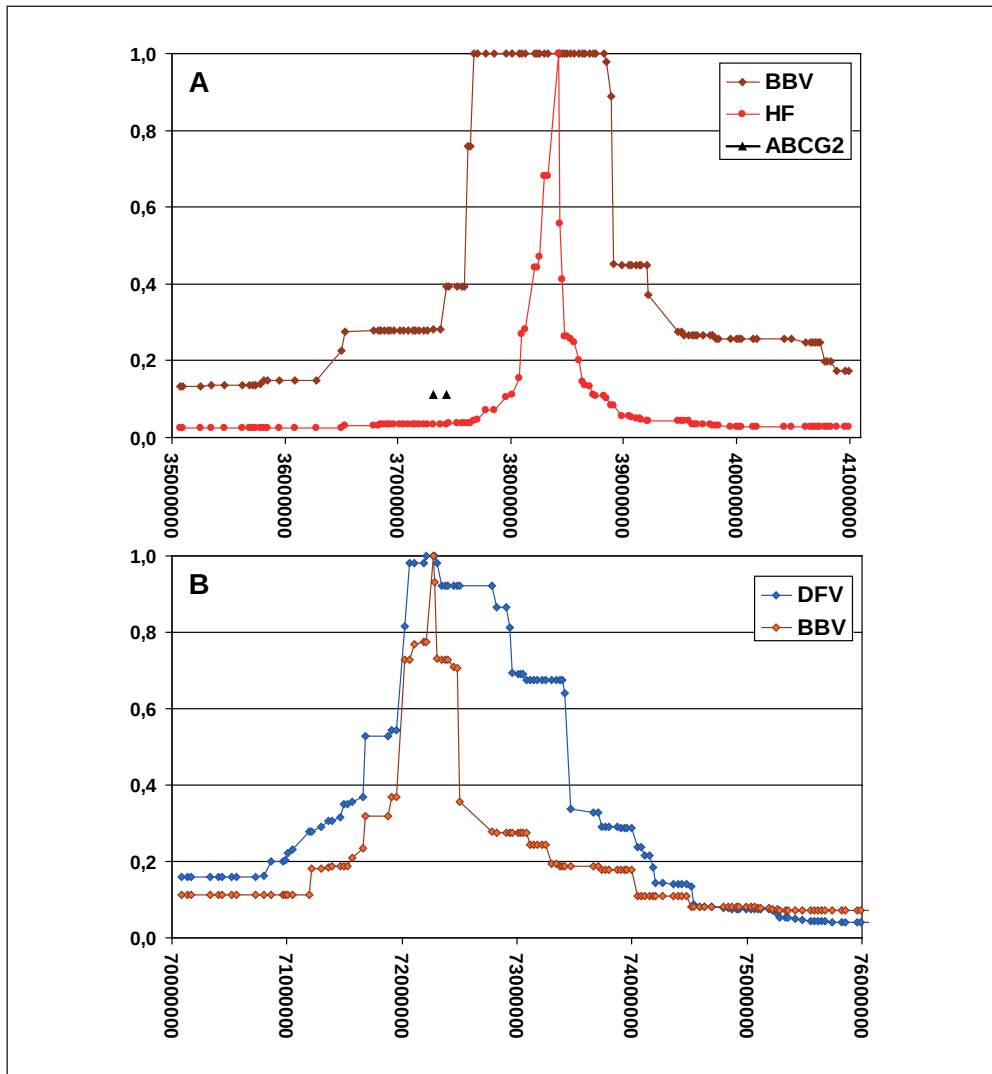


Abb. 5 EHH-Werte als Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig ausgewählte Chromosomen, die den gleichen Haplotyp von Interesse tragen, herkunftsgleich sind in zwei Rinderrassen auf BTA06. Auf der X-Achse ist die physikalische Position einzelner Marker in Basenpaaren (bp) dargestellt. Die Y-Achse präsentiert den rassenspezifischen EHH-Wert. (A) Positive Selektion und lange Region mit kompletter Fixierung ($EHH = 1$) in Braunvieh (BBV) verglichen mit Red-Holstein (RH). Die Dreiecke zeigen die Position des ABCG2-Gens, welches das Ziel einer positiven Selektion in Holstein-Rindern ist (siehe HAYES et al. 2008). (B) Positive Selektion und kurze Region mit kompletter Fixierung ($EHH = 1$) in Fleckvieh (DFV) verglichen mit Braunvieh (BBV).

fort (PICKRELL et al. 2009, GROSSMAN et al. 2010). Da Human- und Nutztierpopulationen nicht in jeder Hinsicht vergleichbar sind, ist eine vorsichtige Übertragung und Adaptierung von Methoden aus der Humangenetik in die Tierzucht sehr wichtig. Hohe Diversität zwischen divergent selektierten Nutztierassen bietet in der Humangenetik nicht denkbare Chan-

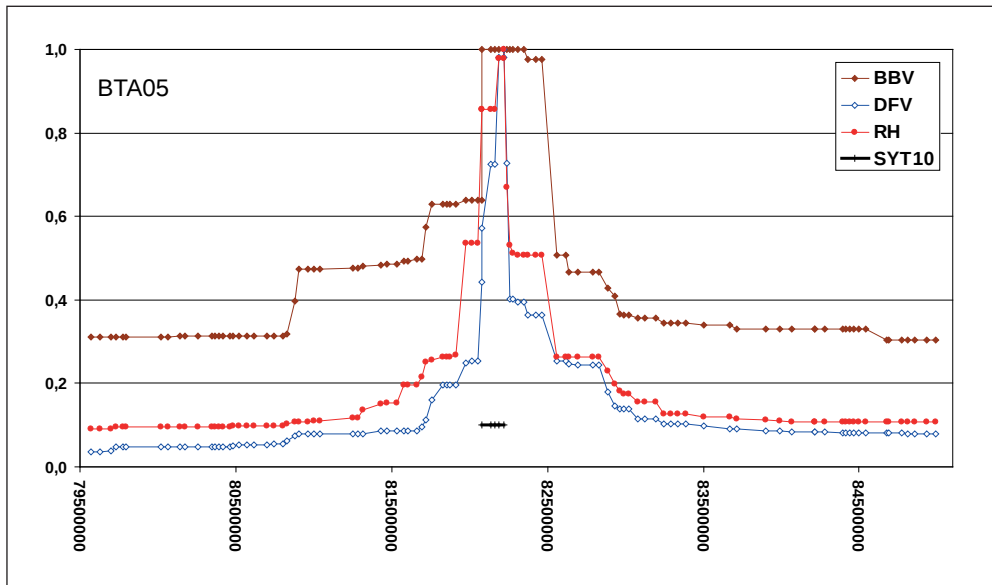


Abb. 6 EHH-Werte zugehörig zu starken R-CCD- und XP-EHH-Signalen für eine positive Selektion auf BTA05 in Braunvieh (BBV) verglichen mit Fleckvieh (DFV) und Red-Holstein (RH). Auf der X-Achse ist die physikalische Position einzelner Marker in Basenpaaren (bp) dargestellt. Die Y-Achse präsentiert den rassenspezifischen EHH-Wert. Das Verhältnis von Oberflächen (Integral) unter der jeweiligen Kurve dient als Grundlage zur Berechnung von unstandardisiertem XP-EHH. Die Position des positionellen Kandidatengens SYT10 wurde in der Höhe 0,1 angedeutet.

cen (ANDERSSON und GEORGES 2004), andererseits werden eine niedrigere Diversität und ein höheres Kopplungsungleichgewicht innerhalb von Rassen erwartet. Es ist also eine Kombination von Methoden und Kartierungsdesigns notwendig, die alle Gegebenheiten in einer Spezies zum Vorteil macht (vgl. GROSSMAN et al. 2010). Zudem wird eine Diskussion über die nachhaltig wichtigsten genetischen Varianten und Merkmale in der Tierzucht notwendig, da die streng selektierten Loci von heute nicht unbedingt die adaptiven Loci für die Zukunft darstellen (LUIKART et al. 2003). Heutige Nutztierassen und Teilpopulationen sind durch verschiedene evolutive Prozesse, die großteils natürliche adaptive und künstliche Selektion beinhalten, geformt. Verschiedene Selektionsereignisse hinterlassen verschiedene Spuren im Genom, die man mit verschiedenen Methoden verfolgen kann. GROSSMAN et al. (2010) zeigten eindrucksvoll, wie Ergebnisse aus verschiedenen Methoden zur Kartierung von Selektionssignalsignalen kombiniert werden können.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Kartierung von Selektionssignalsignalen angewendet. Wir demonstrierten zuerst die Effizienz von Fall-Kontroll-Analysen zur Kartierung von monogenen Merkmalen. Dabei wurde das mittlerweile bekannte kausale BSD-Gen (THOMSEN et al. 2010) mit nur 16 Merkmalsträgern korrekt kartiert. Obwohl für die Kartierung von SAA nur 12 Merkmalsträger genotypisiert wurden, konnte diese Krankheit mit doppelter Präzision in dem vorher beschriebenen chromosomalen Intervall (BUIKAM et al. 2009) kartiert werden. Diese genauere Kartierung hängt mit dem Versuchsdesign und der Markerqualität in den einzelnen Regionen zusammen. Erstens war bei SAA eine Vorselektion von rekombinanten Tieren möglich. Aus

etwa hundert Merkmalsträgern wurden anhand von Mikrosatelliteninformation nur solche ausgewählt, die mindestens einen rekombinanten Haplotyp tragen. Mit diesem Vorgang unterstreichen wir die weiterhin vorhandene Notwendigkeit zur Anhebung von Rekombinationsereignissen in der Kartierungspopulation (vgl. DARVASI 1998). Zweitens waren wir bei BSD durch die Verfügbarkeit von Merkmalsträgern und Haplotypen-Diversität bzw. Markerqualität in der betreffenden chromosomalen Region begrenzt. Alle Merkmalsträger waren für ein Intervall von 56 benachbarten SNP homozygot. Dabei ist der Bulle ELEGANT, Anlageträger und *Founder*, der die Krankheit in BBV eingeführt hat, für die proximale Hälfte der Haplotypen um das Krankheitsgen homozygot. Somit war eine Unterscheidung zwischen einem freien und einem anlagetragenden Haplotypen in der proximalen Hälfte gar nicht möglich. Mit einer höheren Markerdichte und einem Markersatz, der für eine größere Rassenbreite ausgelegt ist, werden solche Situationen seltener. Der BovineSNP50-Chip von der Firma Illumina ist eindeutig erhebungsverzerrt. In unseren Diversitätsstudien mit 105 neutralen Mikrosatelliten (MEDUGORAC et al. 2009) fanden wir die höchste Diversität in unselektierten Rassen, die näher zum Domestikationszentrum vorkommen (z. B. ASV und ILR), eine kontinuierliche Reduzierung von Diversität mit der Entfernung vom Domestikationszentrum und eine gleichzeitige Zunahme an Selektionsintensität. In dieser Studie mit SNP-Chip fanden wir die höchste Heterozygotie in Red-Holstein, obwohl größtenteils das gleiche Tiermaterial genotypisiert wurde. Dies erklären wir durch Erhebungsverzerrung (*ascertainment bias*), da auf dem SNP-Chip Marker mit hoher Informativität für die kosmopolitische Rasse Holstein aufgenommen wurden. VOIGHT et al. (2006) und SABETI et al. (2007) diskutieren Probleme, die durch die Erhebungsverzerrung verursacht werden, und diese sind auch hier nicht zu vernachlässigen.

Mit den oben genannten zwei Beispielen von klassischen Fall-Kontroll-Analysen demonstrierten wir zuerst die Effizienz der Methode, aber auch die weiterhin bestehende Notwendigkeit für eine höhere Markerdichte und -qualität. Die Anwendung von R-CCD in 10 divergent selektierten Rinderrassen brachte weitere Beispiele für eine erfolgreiche Bestätigung (Hornlosigkeit und Doppellender) und Neukartierung von zahlreichen Selektionssignalen. Hier wurden vorläufige Ergebnisse, großteils ohne einen formellen Signifikanztest, dargestellt. Signifikanzschwellen für Selektionssignatursignale sind sehr schwierig festzulegen. Es bieten sich verschiedene Möglichkeiten, einerseits kann eine experimentale Verteilung der geschätzten Statistik verwendet werden (PICKRELL et al. 2009), andererseits bietet sich eine Simulation von evolutiven Vorgängen an (GROSSMAN et al. 2010). Beide Ansätze haben eigene Vor- und Nachteile. Eine Simulation verlangt genaue Kenntnisse über die Vergangenheit bis vor Domestikation der Nutztiere, sodass eine experimentelle Verteilung der Teststatistik eine vorläufig realistischere Option darstellt.

Wir verwendeten vorläufig in unseren Analysen mit Absicht keine iHS-Statistik (VOIGHT et al. 2006), da diese neben Schwierigkeiten mit formellen Signifikanztests zusätzlich noch eine Definition von herkömmlichen und abgeleiteten Allelen verlangt. Da wir uns eine divergente Selektion vorstellen, die nicht nur auf neuen abgeleiteten Allelen basiert, sondern auch auf vor der Domestikation bereits vorhandenen Variationen (*standing variation*), erscheint uns eine Definition von herkömmlichen und abgeleiteten Allelen willkürlich (siehe als Beispiel HAYES et al. 2008). Nehmen wir uns als Beispiel zwei Allele vom gleichen Locus, eins bewirkt höhere Milchleistung, und das andere stärkt durch eine normale, niedrigere Milchleistung direkt eine robuste Fleischproduktion. Diese beiden entgegengesetzten Allelvarianten werden in zwei verschiedenen, divergent selektierten Populationen selektiert, unabhängig

davon, welches die herkömmliche und welches die abgeleitete ist. Trotzdem wird iHS in diesem Fall nur das Selektionssignal an von uns festgelegten abgeleiteten Allelen detektieren.

Wir haben hier verschiedene Tests verwendet und prüfen die Möglichkeiten, diese in einem Ergebnis zu kombinieren. GROSSMAN et al. (2010) zeigten, wie dies bei Tests, die unabhängige Information aus einem gleichen Datensatz nutzen, zu bewerkstelligen ist. Wir nutzen hier nicht nur verschiedene Tests, sondern auch gleiche Tests in verschiedenen Datensätzen, z. B. wird ein signifikanter Test für die Rasse BBV im Vergleich mit mehreren anderen Rassen bestätigt. Hier bietet sich entweder die Auswertung von kombinierten Fallgruppen oder die kombinierte Wahrscheinlichkeit für unabhängige Tests (SOKAL und ROHLF 1998) an. Wie bei GROSSMAN et al. (2010) angedeutet, wird der kombinierte Test von der demografischen Geschichte und Populationsstruktur der zu untersuchenden Spezies abhängen. Obwohl unsere Aufmerksamkeit hauptsächlich den Loci mit fortgeschrittener Selektion in einzelnen Rassen gilt, wird damit nicht nur die durch Selektion bereits verbrauchte genetische Variabilität analysiert. Die hier dargelegten Beispiele zeigen, dass die in einer Rasse verbrauchte genetische Variabilität in anderen Rassen eine neutrale Stellung einnimmt. Obwohl hier nicht ausführlich diskutiert, verhelfen zwei unselektierte Rassen besonders oft und besonders stark der Kartierung von einzelnen Genen unter Selektionsdruck in Doppelnutzungs- sowie Milch- und Fleischrassen. Daher hilft uns dieses Design nicht nur bei der Kartierung sonst nicht kartierbarer Gene, sondern auch bei der Schätzung der verbrauchten genetischen Diversität in einzelnen hoch selektierten Rassen.

Literatur

- ANDERSSON, L., and GEORGES, M.: Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nature Rev. Genet.* 5/3, 202–212 (2004)
- BARENDSE, W., REVERTER, A., BUNCH, R. J., HARRISON, B. E., BARRIS, W., and THOMAS, M. B.: A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. *Genetics* 176, 1893–1905 (2007)
- BROMAN, K. W.: Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Lab. Anim. (NY)* 30, 44–52 (2001)
- BROWNING, B. L., and BROWNING, S. R.: A unified approach to genotype imputation and haplotype-phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *Amer. J. Hum. Genet.* 84, 210–223 (2009)
- BUITKAMP, J., KÜHN, C., SEMMER, J., and GÖTZ, K. U.: Assignment of the locus for arachnomelia syndrome to bovine chromosome 23 in Simmental cattle. *Anim. Genet.* 40, 894–899 (2009)
- CHARLIER, C., COPPIETERS, W., ROLLIN, F., DESMECHT, D., AGERHOLM, J. S., CAMBISANO, N., CARTA, E., DARDANO, S., DIVE, M., FASQUELLE, C., FRENNET, J. C., HANSET, R., HUBIN, X., JORGENSEN, C., KARIM, L., KENT, M., HARVEY, K., PEARCE, B. R., SIMON, P., TAMA, N., NIE, H., VANDEPUTTE, S., LIEN, S., LONGERI, M., FREDHOLM, M., HARVEY, R. J., and GEORGES, M.: Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nature Genet.* 40/4, 449–454 (2008)
- DARVASI, A.: Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature Genet.* 18, 19–24 (1998)
- DARVASI, A.: Dissecting complex traits: the geneticists “Around the world in 80 days”. *Trends Genet.* 21, 373–376 (2005)
- DRÖGEMÜLLER, C., WÖHLKE, A., MÖMKE, S., and DISTL, O.: Fine mapping of the polled locus to a 1-Mb region on bovine chromosome 1q12. *Mamm. Genome* 16, 613–620 (2005)
- DRÖGEMÜLLER, C., ROSSI, M., GENTILE, A., TESTONI, S., JÖRG, H., STRANZINGER, G., DRÖGEMÜLLER, M., GLOWATZKI-MULLIS, M. L., and LEEB, T.: Arachnomelia in Brown Swiss cattle maps to chromosome 5. *Mamm. Genome* 20, 53–59 (2009)

- DUERR, R. H., TAYLOR, K. D., BRANT, S. R., RIOUX, J. D., SILVERBERG, M. S., DALY, M. J., STEINHART, A. H., ABRAHAM, C., REGUEIRO, M., GRIFFITHS, A., DASSOPOULOS, T., BITTON, A., YANG, H., TARGAN, S., DATTA, L. W., KISTNER, E. O., SCHUMM, L. P., LEE, A. T., GREGERSEN, P. K., BARMADA, M. M., ROTTER, J. I., NICOLAE, D. L., and CHO, J. H.: A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461–1463 (2006)
- GROBET, L., MARTIN, L. J., PONCELET, D., PIROTTIN, D., BROUWERS, B., RIQUET, J., SCHOEERLEIN, A., DUNNER, S., MÉNISSIER, F., MASSABANDA, J., FRIES, R., HANSET, R., and GEORGES, M.: A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nature Genet.* 17, 71–74 (1997)
- GROSSMAN, S. R., SHYLAKHTER, I., KARLSSON, E. K., BYRNE, E. H., MORALES, S., FRIEDEN, G., HOSTETTER, E., ANGELINO, E., GARBER, M., ZUK, O., LANDER, E. S., SCHAFFNER, S. F., and SABETI, P. C.: A composite of multiple signals distinguishes causal variants in regions of positive selection. *Science* 327, 883–886 (2010)
- HAYES, B. J., LIEN, S., NILSEN, H., OLSEN, H. G., BERG, P., MACEACHERN, S., POTTER, S., and MEUWISSEN, T. H.: The origin of selection signatures on bovine chromosome 6. *Anim. Genet.* 39/2, 105–111 (2008)
- JIN, C., LAN, H., ATTIE, A. D., CHURCHILL, G. A., BULUTUGLO, D., and YANDELL, B. S.: Selective phenotyping for increased efficiency in genetic mapping studies. *Genetics* 168, 2285–2293 (2004)
- JORDE, L. B., WATKINS, W. S., and BAMSHAD, M. J.: Population genomics: a bridge from evolutionary history to genetic medicine. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2199–2207 (2001)
- LANDER, E. S., and BOTSTEIN, D.: Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185–199 (1989)
- LANDER, E. S., and SCHORK, N. J.: Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 2037–2048 (1994)
- LUIKART, G., ENGLAND, P. R., TALLMON, D., JORDAN, S., and TABERLET, P.: The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Rev. Genet.* 4, 981–994 (2003)
- MANLY, K. F., and OLSON, J. M.: Overview of QTL mapping software and introduction to map manager QT. *Mamm. Genome* 10, 327–334 (1999)
- MEDUGORAC, I., MEDUGORAC, A., RUSS, I., VEIT-KENSCH, C. E., TABERLET, P., LUNTZ, B., MIX, H. M., and FÖRSTER, M.: Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. *Mol. Ecol.* 18/16, 3394–3410 (2009)
- PICKRELL, J. K., COOP, G., NOVEMBRE, J., KUDARAVALLI, S., LI, J. Z., ABSHER, D., SRINIVASAN, B. S., BARSH, G. S., MYERS, R. M., FELDMAN, M. W., and PRITCHARD, J. K.: Signals of recent positive selection in a worldwide sample of human populations. *Genome Res.* 19/5, 826–837 (2009)
- PURCELL, S., NEALE, B., TODD-BROWN, K., THOMAS, L., FERREIRA, M. A. R., BENDER, D., MALLER, J., SKLAR, P., BAKKER, 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.* 81/3, 559–575 (2007)
- RONIN, Y., KOROL, A., SHTENBERG, M., NEVO, E., and SOLLER, M.: High-resolution mapping of quantitative trait loci by selective recombinant genotyping. *Genetics* 164/4, 1657–1666 (2003)
- SABETI, P. C., REICH, D. E., HIGGINS, J. M., LEVINE, H. Z., RICHTER, D. J., SCHAFFNER, S. F., GABRIEL, S. B., PLATKO, J. V., PATTERSON, N. J., McDONALD, G. J., ACKERMAN, H. C., CAMPBELL, S. J., ALTSHULER, D., COOPER, R., KWIATKOWSKI, D., WARD, R., and LANDER, E. S.: Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 419, 832–837 (2002)
- SABETI, P. C., VARILLY, P., FRY, B., LOHMEUILLER, J., HOSTETTER, E., COTSAPAS, C., XIE, X., BYRNE, E. H., MCCARROLL, S. A., GAUDET, R., SCHAFFNER, S. F., LANDER, E. S., and *International HapMap Consortium*: Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature* 449, 913–918 (2007)
- SOKAL, R. R., and ROHLF, F. J.: *Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd ed. New York: W. H. Freeman and Co. 1995
- THOMSEN, B., NISSEN, P. H., AGERHOLM, J. S., and BENDIXEN, C.: Congenital bovine spinal dysmyelination is caused by a missense mutation in the SPAST gene. *Neurogenetics* 11/2, 175–183 (2010)
- TISHKOFF, S. A., REED, F. A., RANCIARO, A., VOIGHT, B. F., BABBITT, C. C., SILVERMAN, J. S., POWELL, K., MORTENSEN, H. M., HIRBO, J. B., OSMAN, M., IBRAHIM, M., OMAR, S. A., LEMA, G., NYAMBO, T. B., GHORI, J., BUMPSTEAD, S., PRITCHARD, J. K., WRAY, G. A., and DELOUKAS, P.: Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature Genet.* 39, 31–40 (2007)

- VOIGHT, B. F., KUDARAVALLI, S., WEN, X., and PRITCHARD, J. K.: A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biol.* 4, e87 (2006)
- WEIR, B. S., and COCKERHAM, C. C.: Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358–1370 (1984)
- XU, Z., ZOU, F., and VISION, T. J.: Improving quantitative trait loci mapping resolution in experimental crosses by the use of genotypically selected samples. *Genetics* 170, 401–408 (2005)

Dr. Ivica MEDJUGORAC
Lehrstuhl für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre
Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
Tierärztliche Fakultät
Veterinärstraße 13
80539 München
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 89 21803310
Fax: +49 89 2180993310
E-Mail: Ivica.Medjugorac@gen.vetmed.uni-muenchen.de

Charakterisierung vom QTL – Stand der QTL-Analyse beim Schwein

Christine GROSSE-BRINKHAUS, Mehmet Ulas CINAR, Muhammad Jasim UDDIN
und Karl SCHELLANDER (Bonn)

Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurden über 5000 QTL (*Quantitative Trait Loci*) für 546 unterschiedliche Merkmale beim Schwein identifiziert. Für quantitative Merkmale wurden so die komplexen genetischen Strukturen erforscht und die Grundlage für weitergehende Untersuchungen geschaffen. Die Herausforderung ist nun, die bisher identifizierten QTL-Regionen weiter einzugrenzen, weitere genetische Effekte und Mechanismen mit in die Modelle aufzunehmen sowie zusätzliche Merkmale in Form von Genexpressionsprofilen zu erfassen. Nur so lassen sich für spezifische Merkmale einzelne potentielle Kandidatengene identifizieren und Gen-Netzwerke charakterisieren. Dieser Artikel soll einen Überblick über den bisherigen Stand der Analysen von QTL-Studien und die darüber hinausgeführten weiteren genetischen Untersuchungen beim Schwein geben.

Abstract

In the recent years more than 5000 QTL (*Quantitative Trait Loci*) for 546 different traits in pig have been identified. Especially for quantitative traits it was possible to investigate the complex structure of the genetic background. These results are the general basis for further analysis. The next challenge will be to refine the genomic QTL regions, to consider additional genetic effects and mechanisms and to record other traits like gene expression patterns. Taking all this into account, it will be possible to identify more candidate genes and build up gene networks. The main target of this article is to give an overview of the so far performed QTL investigations and additional genetical analysis in pig.

1. Einleitung

Quantitative Merkmale werden durch viele Genorte (QTL, *Quantitative Trait Loci*) beeinflusst. Die Identifikation dieser QTL ist die Grundlage der positionellen Ableitung von Kandidatengenen, die einen kausalen Zusammenhang mit der Merkmalsvariation haben. In der Schweineproduktion spielen vor allem Merkmale von ökonomischer Wichtigkeit eine große Rolle, die sich durch eine sehr hohe phänotypische Variation auszeichnen. Für Tierzüchter hat sich das Werkzeug der QTL-Studie als hilfreich erwiesen, da mit dieser ein Teil der Variation der Phänotypen zu erklären ist. Dieser Artikel hat zum Ziel, einen Überblick über die QTL-Analyse und exemplarisch den Stand von verschiedenen Merkmalskomplexen zu geben. Zunächst werden in diesem Abschnitt wesentliche Grundlagen beschrieben.

1.1 Genetische Marker

Grundlage für diese Untersuchungen ist die Verfügbarkeit von DNA-Markern, die genetisch oder physikalisch kartiert wurden und somit zusammen eine dichte Markerkarte bilden. Dies

konnte für viele landwirtschaftliche Nutztiere mit Hilfe von einer Vielzahl von hoch polymorphen Mikrosatelliten erreicht werden. Beim Schwein wurde in den frühen 1990er Jahren das Projekt PiGMap eingerichtet, um das Genom zu kartieren. Mittlerweile sind beim Schwein in der *USDA MARC Database* mehr als 1350 Mikrosatelliten kartiert worden. QTL, die mittels dieser Markertypen gefunden werden konnten, weisen jedoch sehr große Konfidenzintervalle auf. Um diese großen Regionen zu verkleinern, sind 5 bis 10 Marker je cM notwendig, die es ermöglichen, „whole genome association“-Analysen durchzuführen (DU et al. 2007). Eine solche Markerdichte kann nur mittels Chiptechnologien für verschiedene Untersuchungen erzielt werden. In einer Studie von RAMOS et al. (2009) wurden die Informationen von 372 886 SNP genutzt, um daraus den Illumina 60k SNP-Beadchip zu entwickeln. Des Weiteren ermöglicht das „porcine genome sequencing“-Projekt, verschiedene Regionen näher zu charakterisieren (FLICEK et al. 2010).

1.2 Populationen

Entscheidend für die Identifikation von QTL ist, neben der Wahl der Marker, das Design der zu untersuchenden Population. Generell wird zwischen Kreuzungen von zwei Linien und segregierenden Populationen unterschieden.

Die Voraussetzung für eine Kreuzungszuchtpopulation bilden Elternlinien, die sich merkmalspezifisch genetisch stark voneinander unterscheiden. So ist es möglich, dass die genetischen Marker innerhalb der Population für die entsprechenden Genomregionen segregieren (WELLER 2001). Beim Schwein wurden dazu in verschiedenen Untersuchungen experimentelle F_2 -Populationen aus Kreuzungen kommerzieller Linien mit zum Teil exotischen Rassen, z. B. Wildschwein mit Large White (ANDERSSON-EKLUND et al. 1998) oder die chinesische Rasse Meishan mit verschiedenen kommerziellen Rassen, genutzt (DE KONING et al. 2001, SATO et al. 2003). Allerdings wurden in einer Reihe von QTL-Studien auch Kreuzungen aus zwei oder mehreren kommerziellen Rassen eingesetzt, z. B. Berkshire mit Yorkshire oder Duroc mit Pietrain (LIU et al. 2007, MALEK et al. 2001). Des Weiteren gibt es Rückkreuzungspopulationen, bei denen die F_1 -Generation mit einer Linie der parentalen Generation zurückgekreuzt wird (SANCHEZ et al. 2006). Dies ermöglicht es, spezifisch Tiere, die den rekombinanten Chromosomenbereich tragen, miteinander anzupaaren und so den QTL auch im Verhältnis zur Rekombinationsrate zu beurteilen.

Eine andere Strategie ist die Untersuchung von segregierenden Populationen mittels Voll- und Halbgeschwistergruppen sowie die Anwendung von Tiermodellen. Dies ermöglicht die Betrachtung der Population an sich, ohne die Annahme von Anzahl und Frequenzen von QTL-Allelen in den Ausgangslinien, wie dies bei Kreuzungspopulationen eine Rolle spielt (BIDANEL et al. 2001, DE KONING et al. 2001, WIMMERS et al. 2008). Dadurch ist es möglich, den Anteil genetischer Variation zu identifizieren, der nicht unbedingt auf die Fixierung von Genorten in den Ausgangslinien zurückzuführen ist.

1.3 Methoden

Die genetische Manifestierung quantitativer Merkmale kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden untersucht werden. Dabei werden grundsätzlich die Informationen der Phänotypen (das gemessene Merkmal) mit den Informationen der Genotypen (die erfassten genetischen Marker) in Beziehung zueinander gesetzt.

Generell wird zwischen verschiedenen Ansätzen der Markerregression auf Grundlage der Analyse der Varianz (ANOVA) und der Intervall-Kartierung, z. B. mittels *Maximum-Likelihood*-Schätzungen (ML) zur Detektion von QTL unterschieden (LANDER und BOTSTEIN 1989, SOLLER et al. 1976). Der Unterschied zwischen beiden Methoden ist, dass bei der ML-Schätzung angenommen wird, jedes Individuum habe entweder ein q-Allel oder ein Q-Allel bekommen. Somit wird von zwei Verteilungen ausgegangen. Unterschiede werden auf Grundlage der Genotypen identifiziert. Hingegen wird beim Regressionsansatz eine Normalverteilung innerhalb der Markergruppen angenommen. Des Weiteren hat die Varianzanalyse im Gegensatz zur Intervallkartierung drei wesentliche Nachteile:

- Der eigentliche QTL-Effekt kann nicht separat geschätzt werden;
- Tiere mit fehlenden Genotypinformationen können nicht berücksichtigt werden; und
- die Detektionspower nimmt mit zunehmender Distanz der Marker zueinander ab (BROMAN 2001).

In den meisten Untersuchungen wird daher die Intervallkartierung angewendet. Eine deutlich größere Vielfalt gibt es bei der Parameterschätzung für die einzelnen Effekte, von Grenzwertschätzungen bis hin zu bayesschen Wahrscheinlichkeiten. Grundlegend für die Entscheidung, welche Methode zur Parameterschätzung gewählt wird, sind das Design der Population und die untersuchten Merkmale.

2. QTL für Merkmale Stülpzitze, Osteochondrose, Fleischqualität und Immunantwort

In den letzten Jahrzehnten wurden mit großem Aufwand eine Reihe von QTL identifiziert und lokalisiert, die sich mit den meisten wichtigen ökonomischen Merkmalen beim Schwein assoziieren ließen. Insgesamt wurden 6433 QTL für 594 unterschiedliche Merkmale beschrieben (Stand 4. Januar 2012). Einen guten Überblick über die bisher durchgeführten QTL-Studien geben hier eine Reihe von Datenbanken (HU et al. 2005). Im folgenden Abschnitt werden exemplarisch binäre Merkmale wie die Stülpzitze, ordinale Merkmale wie ein Teil der Fundamentbewertung und die komplexen Merkmale der Fleischqualität und der Immunantwort vorgestellt. Darüber hinaus gibt es noch eine Vielzahl an weiteren QTL-Studien, die sich mit Gesundheits-, Wachstums-, Schlachtkörper- und Reproduktionsparametern befassen.

2.1 Stülpzitze

Der Erbfehler Stülpzitze ist einer der bedeutendsten Gesäugeanomalien in der Schweineproduktion. Der Phänotyp der defekten Zitze ist die fehlende Zitzenkuppe sowie der nicht entwickelte Zitzenkörper. Dies führt bei der Laktation der Sau zu einem erschwerten Milchfluss (WIESNER und WILLER 1977). Trotz züchterischer Selektion gegen dieses Phänomen ist es in allen Schweinepopulationen vertreten (MAYER und PIRCHNER 1995). Die Heritabilität dieses Merkmals liegt zwischen 0,2 und 0,5, so dass als mögliche Ursache die Beteiligung von einem Majorgen und weiteren Minorgen angenommen werden kann (BREVERN et al. 1994). Eine Studie von JONAS et al. (2008), sowohl in einer Duroc × Berliner Miniaturschwein F₂-Kreuzung als auch kommerziellen Mutterlinien, zeigte vier QTL-Regionen in überlappenden Intervallen auf SSC3, SSC4, SSC6 und SSC11. Diese Regionen ließen sich mit einer Reihe von positionellen und funktionellen Kandidatengenomen assoziieren.

2.2 Lineare Fundamentbewertung – Osteochondrose

Fundamentprobleme beim Schwein haben neben einer ökonomischen Bedeutung auch eine starke Relevanz für das Wohlbefinden des Tieres. 20 bis 50 % aller getesteten Eber aus Leistungsprüfungen werden auf Grund von Fundamentproblemen ausgesiekt (WEBB et al. 1983). Eine der Hauptursachen dieser Erkrankung ist Osteochondrose. Diese charakterisiert sich durch eine Reihe von Skeletterkrankungen, wie Störung der Knochenbildung, Knorpel-Retention, Nekrosen des Knochengewebes u. a. (JORGENSEN 2000). Die Erfassung dieses Merkmals ist aufwändig. Möglichkeiten bilden dabei die sogenannte „Lineare Beschreibung“ oder auch „Fundamentbewertung“ anhand eines Punktesystems (VANSTEENBERGEN 1989). Weitere Methoden bilden Untersuchung von histologischen Schnitten der Knochen sowie Knochendichtemessungen mittels DXA-Methode.

In einer eigenen Studie wurden 15 QTL-Regionen, die sich mit den Fundamentmerkmalen assoziieren ließen identifiziert. Interessante QTL waren auf den Chromosomen 2, 5, 6 und 9 zu finden, die sich durch wiederholte Identifikation auf Grund unterschiedlicher Merkmale charakterisierten. Des Weiteren ließen sich diese Regionen mit funktionellen Kandidatengenen in Beziehung setzen, wie MGP (Matrix-gla-Protein) und IGF1 (*Insulin like growth factor 1*) auf SSC5 (LAENOI et al., mündliche Mitteilung.).

In einer Arbeit von ANDERSSON-EKLUND et al. (2000) wurden F₂-Tiere einer Kreuzung aus Wildschwein und Large White untersucht, mit dem Ziel neben QTL für Knochenmerkmale auch QTL für Knochenmaße zu identifizieren. QTL für die Knochenmaße wurden auf den Chromosomen 2, 4, 16 und 17 und für Osteochondrose auf den Chromosomen 5, 13 und 15 gefunden.

2.3 Fleischqualität und Wasserbindungsvermögen

Die Fleischqualität variiert in ihrer Ausprägung in verschiedenen Schweinerassen und deren Kreuzungen. Sie wird u. a. durch die phänotypischen Merkmale pH-Wert, Leitfähigkeit, Fleischfarbe und Tropfsaft charakterisiert. Für das Merkmal Tropfsaftverluste wurde bisher die größte Anzahl an QTL, insgesamt 936, identifiziert (HU et al. 2005).

Hinsichtlich Fleischqualität und Schlachtkörperzusammensetzung führten LIU et al. (2007) einen genomweiten QTL-Scan in einer Duroc×Piétrain-F₂-Population durch und konnten 24 signifikante und 47 suggestive QTL identifizieren. Des Weiteren konnten auf Chromosom 1 (SSC1) mehrere QTL für pH-Wert 24 h nach der Schlachtung für Kotelett und Schinken nachgewiesen werden. Diese erklärten 11,84 % und 9,08 % der phänotypischen Varianz. Für Tropfsaft wurden Regionen auf SSC2, SSC3, SSC5 und SSC18 identifiziert.

In einer vergleichbaren Studie von EDWARDS et al. (2008) konnten 94 QTL des Merkmalskomplexes Fleischqualität identifiziert werden. Ebenfalls wurde in dieser Studie ein QTL für pH-Wert auf Chromosom 1 beobachtet, der vergleichbare Signifikanzniveaus aufwies wie in der Studie von LIU et al. (2007). Ebenfalls bestätigt wurde der QTL für Tropfsaftverluste auf SSC5 durch eine Studie von THOMSEN et al. (2004). In einer weiteren Studie von LIU et al. (2008) wurde die Untersuchung in einem Halbgeschwistermodell sowie einem kombinierten Modell aus Linien- und Halbgeschwisterdesign durchgeführt. Dadurch war es möglich, weitere 47 QTL-Regionen mittels Halbgeschwistermodell sowie 28 Regionen mit Hilfe eines kombinierten Modells zu identifizieren. Das Halbgeschwistermodell ermöglicht es, QTL zu identifizieren, obwohl die QTL unterschiedliche Allele in den Ausgangslinien mit vergleichbaren Allelfrequenzen besitzen (DE KONING et al. 1999).

WIMMERS et al. (2006) führte eine QTL-Studie für Muskelfaserarten und -zusammensetzung sowie für Fleischqualität in einer Duroc×Berliner Miniaturschwein-Kreuzung durch. Dabei zeigte sich, dass sich die QTL für Fleischqualität zum Großteil mit den mikrostrukturellen Eigenschaften der Muskulatur des Schweins vereinbaren ließen. Folglich kann geschlossen werden, dass Pleiotropie eine bedeutende Rolle bei komplexen Merkmalen wie Muskelfaser- und Fleischqualität spielt. Eine Reihe von potentiellen Kandidatengen wurde spezifisch für diese Regionen und mit Bezug zur Fleischqualität von JENNEN et al. (2007) vorgeschlagen. Die Identifikation von Kandidatengen basiert auf den Informationen der physikalischen Kartierung für die Region, in denen der oder die QTL gefunden wurden. Auf Grund mangelnder Informationen, in Bezug auf gefundene oder auch nicht gefundener Gene innerhalb der lokalisierten QTL, besteht jedoch das Risiko falsch-positiver QTL und limitiert in einigen Teilen die Untersuchung.

2.4 Immunantwort

Merkmale der Immunantwort und der Krankheitsresistenz werden vor allem durch eine Reihe von Umwelt- und individuellen Tierfaktoren beeinflusst. Dennoch spielen genetische Kontrollmechanismen eine entscheidende Rolle in der Verbesserung der Immunkompetenz von Schweinen. QTL-Untersuchungen für Immunmerkmale wurden erstmals von EDFORS-LILJA et al. (1998) für die humorale und die zelluläre Immunantwort durchgeführt. Diese Arbeitsgruppe identifizierte vier QTL-Regionen im Zusammenhang mit Leukozytenzahl, mitogeninduzierter Proliferation und Impfreaktionen auf *E. coli*.

In eine Studie von WIMMERS et al. (2008), mit einer Rückkreuzungspopulation von Duroc und Berliner Miniaturschweinen, konnten 42 signifikante QTL im gesamten Genom gefunden werden. Als Merkmal wurde die Antikörperantwort zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Impfung von Tetanus, PRRSV (Porzine Reproductive Respiratorische Syndrom-Virus) und *Mykoplasma hyopneumoniae* erfasst. Dies ermöglichte es, wiederholt QTL in gleichen Genomregionen in Hinblick auf unterschiedliche Messzeitpunkte zu detektieren. So konnte für Chromosom 10 eine Reihe von potentiellen Kandidatengen für die Immunantwort von *Mykoplasma hyopneumoniae* in Betracht gezogen werden. Die Merkmale der Immunantwort von PRRSV und *Mykoplasma hyopneumoniae* wurden ebenfalls innerhalb einer F₂-Kreuzung aus Duroc und Berliner Miniaturschweinen erfasst. Mittels unterschiedlicher Modelle konnten auf diese Weise 42 (F₂-Design) und 21 (Halbgeschwister-Design) QTL identifiziert werden (WIMMERS et al. 2009). Die QTL-Regionen der beiden Modelle überschneiden sich zum Teil. Dies verdeutlicht, dass Genregionen teilweise in einer der Reinzuchtlinien fixiert sind, aber auch, dass der Phänotyp in der F₂-Generation sehr stark segregiert.

3. Nicht-mendelsche QTL

3.1 Imprinting-QTL

Ein Teil der autosomalen Gene wird durch sogenanntes genomisches Imprinting beeinflusst. Diese Prägung beruht auf einem elterlichen Allel, welches maternaler oder paternaler Herkunft ist. Genomisches Imprinting ist ein epigenetischer Mechanismus, der bei höheren Säugetieren (Plazentatieren) konserviert wurde. Änderungen oder Defekte im Imprinting führen oft zu Schäden des embryonalen und neonatalen Wachstums (HORSTHEMKE et al. 1999).

Eine Studie von NEZER et al. (1999) konnte eine QTL-Region und entsprechende Gene, die dem Imprinting-Effekt unterliegen, identifizieren. Dazu wurden Schweine der Rassen Large White und Pietrain bis zur F₂-Generation miteinander gekreuzt. Die Identifikation der QTL-Regionen erfolgte mittels Mikrosatelliten an 677 F₂-Tieren. Eine QTL-Region am distalen Ende von SSC2 wurde für 5 Merkmale identifiziert (Magerfleischanteil, Schinkenanteil, Kotelettanteil, Rückenspeckdicke, Fettanteil am Schlachtkörper und Rückenspeckanteil). Kopplungsanalysen in dieser Region zeigten Assoziationen mit den Genen IGF2 und MYOD1. Die Schätzung der Effekte an beiden Genorten zeigte, dass sich 50 % des phänotypischen Unterschiedes von Pietrain zu Large White beim Merkmal Magerfleischanteil dadurch erklären ließen. In einer weiteren Studie, einer experimentellen Kreuzung aus chinesischen Meishan und kommerziellen Niederländischen Schweinen, wurde die Bedeutung von Imprinting auf die Schlachtkörperzusammensetzung untersucht. Neben eines Imprinting-QTL für Rückenspeckdicke auf SSC2 wurden weitere Genregionen auf SSC6 für intramuskulären Fettgehalt und auf SSC7 für Muskelfläche bzw. Rückenspeckdicke identifiziert (DE KONING et al. 2000). LIU et al. (2007) identifizierte ebenfalls auf Chromosom 2 QTL für Magerfleischanteil und Fleischfettverhältnis, in denen ebenfalls IGF2 positioniert ist.

3.2 Epistatische QTL-Paare

Die meisten QTL-Untersuchungen enthalten in den Auswertungsmodellen additiv genetische Effekte und Dominanz; Interaktionseffekte zwischen zwei Genorten, Epistasie, bleiben oft unberücksichtigt. Epistatische Effekte in Form von QTL-Interaktionen wurden bislang überwiegend an Labortieren wie Mäusen und Ratten untersucht (BROCKMANN et al. 2000), jedoch nur vereinzelt bei landwirtschaftlichen Nutztieren beschrieben (ROTHSCHILD et al. 2007). Untersuchungen bei Hühnern zeigten, dass sich mit Hilfe von epistatischen QTL-Paaren bis zu 80 % der genetischen Variation, bezogen auf Wachstumsmerkmale, erklären ließen (CARLBORG und HALEY 2004). Untersuchungen bei Schweinen wurden bisher kaum durchgeführt. ESTELLE et al. (2008) beobachteten Epistasie in einer Kreuzung aus Iberischen Schweinen und Landrasse-Schweinen für Muskelfasermerkmale. Dabei konnten für 7 Merkmale 10 epistatische QTL-Paare identifiziert werden. In einer Studie von DUTHIE et al. (2010) wurden interagierende QTL-Regionen für Schlachtkörpermerkmale identifiziert. Diese erklärten bis zu 10 % der phänotypischen Varianz. In einer vergleichbaren eigenen Studie wurde neben Merkmalen des Schlachtkörpers auch die Fleischqualität untersucht. Zu fast jedem Merkmal konnte mindestens ein epistatisches QTL-Paar identifiziert werden (GROSSE-BRINKHAUS et al. 2009). Interessant sind an dieser Stelle wiederholt auftretende Interaktionen zwischen Genomregionen, die auf enge genetische und biochemische Beziehungen schließen lassen.

4. Identifikation von positionellen und funktionellen Kandidatengen

Die Auswahl von potentiellen Kandidatengen beim Schwein beruhte bisher auf den Informationen der physikalischen Kartierung von bereits bekannten Genen für diese Region, auf Literaturangaben und auf Analysen von Homologien zum Menschen oder experimentellen Tierarten wie Maus und Ratte. Auf Grund mangelnder Informationen in Bezug auf gefundene oder auch nicht gefundene Gene innerhalb der lokalisierten QTL besteht das Risiko falsch-positiver QTL, dies limitiert in einigen Teilen die Untersuchung. Um dieses Risiko zu mini-

mieren, ist es zusätzlich hilfreich, das Expressionsniveau der ausgewählten Gene mit in die Analysen aufzunehmen. Bedeutende biologische Eigenschaften der Merkmale werden oftmals direkt durch die Transkriptionsmuster abgebildet. Daher sind die Variationen von quantitativen Merkmalen für gewöhnlich die Konsequenz aus genetischen Regulationsnetzwerken und einzelnen Faktoren, die die Dynamik dieser Netzwerke kontrollieren (FRANK 2003).

4.1 Transkriptionsanalysen

Klassischerweise werden die funktionellen Kandidatengenanalysen als Transkriptionsanalysen durchgeführt, in denen ein mögliches Kandidatengen mit Hilfe signifikanter Unterschiede zwischen den Expressionsniveaus im untersuchten Gewebe identifiziert wird (ZHU und ZHAO 2007). Verbessert wurde diese Form der Untersuchung mittels Mikroarray-Techniken (BURT und HOCKING 2002, ROTHSCILD 2004). Mikroarrays bieten die Möglichkeit, viele Gene in Kombination mit einer großen Anzahl an Individuen zu untersuchen, so dass Gene identifiziert werden können, die eine sehr große Variation innerhalb einer Population aufweisen. Das Expressionsniveau von hoch variablen Genen in einem Individuum kann dann als Phänotyp angesehen werden, der möglicherweise auch durch andere genetische Determinanten beeinflusst wird. In den Studien von PONSUKSILI et al. (2008a, b) konnten anhand der Ergebnisse einer Transkriptionsanalyse erfolgreich Kandidatengene für das Wasserhaltevermögen identifiziert werden. Für die Analyse wurden 74 diskordante Halbgeschwister der Duroc × Pietrain-Population mit divergentem Phänotyp sowohl für Tropfsaftverluste als auch für pH-Werte ausgewählt und anschließend die Transkriptionsprofile der einzelnen Tiere miteinander verglichen. Die unterschiedlich stark exprimierten Gene konnten mittels Korrelationsanalyse auf ihre Assoziation mit den Phänotypen überprüft werden.

4.2 eQTL-Analyse

Mit dem Einsatz von Mikroarrays Ende der 1990er Jahre ist es möglich, innerhalb von genomübergreifenden Studien die Genregulierung auf Grundlage der Genexpression zu beurteilen. Diese Form der Validierung von Genen erfolgt mit Hilfe von eQTL (*expressions* QTL)-Studien. Mittels *Real-Time*-PCR und Multiplex-Genexpressions-PCR kann das Transkriptionsprofil für verschiedene Gene innerhalb einer Population erfasst werden. Durch die Integration dieses Expressionsniveaus in die QTL-Analyse ist es möglich, die Beziehungen zwischen bereits identifizierten QTL, dem eigentlichen Genort und anderen genomischen Regionen näher zu beschreiben (JANSEN und NAP 2001). Dabei bietet diese Untersuchung die Möglichkeit, zwischen *cis*- und *trans*-agierenden Genorten zu unterscheiden und eröffnet so die Erstellung von Regulationsnetzwerken in Bezug auf die Genexpression (LI et al. 2005). Ein *cis*-agierender eQTL bedeutet, dass das Gen physikalisch in dieser Region lokalisiert ist, im Gegensatz zu *trans*-agierend, wo der QTL des Expressionsprofils eines Gens nichts mit der eigentlichen genomischen Position des Gens zu tun hat. Dennoch treten *trans*-agierende eQTL häufiger auf als *cis*-agierende, für eine Reihe von Genen wird ein sogenanntes Cluster in einer Region identifiziert. Die Ursache wird in der Regulierung verschiedener Gene durch ein Majorgen vermutet (YVERT et al. 2003). Die Validierung der Untersuchungen von PONSUKSILI et al. (2008a) ergab 104 potentielle Kandidatengene für die Merkmale pH-Wert und Tropfsaft, von denen 8 als *cis*- und 96 als *trans*-agierend charakterisiert werden konnten.

5. Von QTL zum Gen

Mit der Identifikation von QTL-Regionen kann noch nicht auf ein oder mehrere spezifische Gene geschlossen werden. Mittels Feinkartierung werden interessante Loci weiter eingegrenzt. Des Weiteren ist es notwendig, die Ursachen in Form von SNP (*single nucleotide polymorphism*) zu charakterisieren, die zu den unterschiedlichen Phänotypen führen.

Bereits in Abschnitt 4. wurde der Imprinting-QTL auf Chromosom 2 für Schlachtkörpermerkmale beschrieben. NEZER et al. (1999) charakterisierten diesen QTL als paternal geprägt und führte ein SNP-Screening auf Grundlage von homologen humanen Informationen durch. Als funktionales und positionelles Kandidatengen wurde neben IGF2 (*insulin-like growth factor 2*) auch MYOD1 (*myogenic differentiation 1*) diskutiert. In der Analyse von IGF2 konnte dabei ein Nukleotidaustausch von G zu A in Exon 2 gefunden werden. Die Kartierung dieses SNP zeigte eine enge Kopplung mit dem Mikrosatellitenmarker SWC9 und bestätigte damit die Rolle von IGF2 als Kandidatengen. Weiterführende Untersuchungen zeigten eine weitere Mutation im Intron 3. Dieser SNP ist in einer CpG-Insel lokalisiert und bewirkt eine erhöhte Expression von IGF2-mRNA im postnatalen Muskel, wenn die Mutation vom Vater übertragen wurde (VAN LAERE et al. 2003).

Eine weitere Kandidatengenstudie bezieht sich auf CAST (*Calpastatin*), dem ebenfalls eine QTL-Region auf SSC2 zugrunde liegt (CIOBANU et al. 2004). Im Vergleich zu IGF2, welches auf dem p-Arm dieses Chromosoms lokalisiert ist, liegt CAST auf dem q-Arm. In einer F₂-Kreuzung aus Berkshire und Yorkshire wurde ein suggestiver QTL für die Merkmale von gekochtem Fleisch und Festigkeit von rohem Fleisch anhand eines Scores identifiziert (MALEK et al. 2001). Mittels Feinkartierung und SNP-Detektion konnte so zunächst eine neue Markerkarte entwickelt werden. Die Sequenzierung von merkmalsextrremen F₃-Tieren dieser Kreuzung, Tieren der F₂-Kreuzung und weiteren kommerziellen Tieren zeigte 12 Mutationen, sowohl funktionalen als auch stillem Charakters. Die Haplotypen- und Assoziationsanalyse verwies schließlich auf zwei interessante funktionale Polymorphismen, die in allen Populationen auftraten (CIOBANU et al. 2004).

Das PRAKG3 (*Protein kinase adenosine monophosphate activated gamma3-subunit*)-Gen ist ein Beispiel für eine nicht-konservierte Mutation im Vergleich zu CAST. In einer Studie von MILAN et al. (2000) wurden sechs Reinzuchtrassen untersucht und diese jeweils mit der genetischen Sequenz der Rasse Hampshire verglichen. Insgesamt wurden sieben Mutationen identifiziert. Des Weiteren war es möglich eine Mutation am Codon 200, die mit dem RN--Allel assoziiert ist, zu identifizieren. An dieser Stelle ist der SNP nur in Tieren der Rasse Hampshire zu finden, die ebenfalls das RN--Allel tragen. Die Identifikation des RN-Gens erfolgte mittels QTL-Kartierung in Bezug auf hohe Glykogengehalte im Skelettmuskel, was die Grundlage für die Interaktion und enge Kopplung mit dem PRAKG3-Gen bildete (MILAN et al. 1996).

6. Ausblick

Zurzeit werden Methoden eingeführt, die die schnelle Genotypisierung mit Hilfe von SNP-Markern beinhalten. Diese genetischen Marker sind gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt. Die Grundlage dieser Form der genomweiten Assoziationsstudie bilden Arrays, die mit spezifischen populationsübergreifenden SNP ausgestattet sind. SNP bilden die umfangreiche genetische Variation im Genom ab und ermöglichen so eine gezielte und schnelle

Identifizierung von Kandidatengenen für komplexe Merkmale. Zusätzlich bieten diese neuen molekularen Informationen die Chance für die Tierzucht im Rahmen einer verbesserten Marker-assistierten Selektion oder die Schätzung von genomischen Zuchtwerten. Des Weiteren könnten alle vorgestellten Methoden, von QTL-, über Transkriptom- bis zu genomweiten Assoziationsanalysen, in Kombination dazu beitragen, die Suche und präzise Identifikation von Kandidatengenen zu verbessern.

Literatur

- ANDERSSON-EKLUND, L., MARKLUND, L., LUNDSTROM, K., HALEY, C. S., ANDERSSON, K., HANSSON, I., MOLLER, M., and ANDERSSON, I.: Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a wild boar $\times$ Large White intercross. *J. Anim. Sci.* 76, 694–700 (1998)
- ANDERSSON-EKLUND, L., UHLHORN, H., LUNDEHEIM, N., DALIN, G., and ANDERSSON, L.: Mapping quantitative trait loci for principal components of bone measurements and osteochondrosis scores in a wild boar $\times$ Large White intercross. *Genet. Res.* 75, 223–230 (2000)
- BIDANEL, J. P., MILAN, D., IANNUCELLI, N., AMIGUES, Y., BOSCHER, M. Y., BOURGEOIS, F., CARITEZ, J. C., GRUAND, J., LE ROY, P., LAGANT, H., QUINTANILLA, R., RENARD, C., GELLIN, J., OLLIVIER, L., and CHEVALET, C.: Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genet. Sel. Evol.* 33, 289–309 (2001)
- BREVERN, N., SCHIMPF, B., WÖRNER, R., und SWALVE, H.: Parameterschätzung für Zitzenmerkmale bei Hybridsauen. *Züchtungskunde* 66, 339–348 (1994)
- 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 $\times$ DBA/2 mice. *Genome Res.* 10, 1941–1957 (2000)
- BROMAN, K. W.: Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Laboratory Animals* 30, 44–52 (2001)
- BURT, D. W., and HOCKING, P. M.: Mapping quantitative trait loci and identification of genes that control fatness in poultry. *Proc. Nutr. Soc.* 61/4, 441–446 (2002)
- CARLBORG, O., and HALEY, C. S.: Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nature Rev. Genet.* 5, 618–622 (2004)
- CIOBANU, D. C., BASTIAANSEN, J. W. M., LONERGAN, S. M., THOMSEN, H., DEKKERS, J. C. M., PLASTOW, G. S., and ROTHSCILD, M. F.: New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J. Anim. Sci.* 82, 2829–2839 (2004)
- DU, F. X., CLUTTER, A. C., and LOHUIS, M. M.: Characterizing linkage disequilibrium in pig populations. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 166–178 (2007)
- DUTHIE, C., SIMM, G., DOESCHL-WILSON, A., KALM, E., KNAP, P. W., and ROEHE, R.: Epistatic analysis of carcass characteristics in pigs reveals genomic interactions between quantitative trait loci attributable to additive and dominance genetic effects. *J. Anim. Sci.* 88/7, 2219–2234 (2010)
- EDFORS-LILJA, I., WATTRANG, E., MARKLUND, L., MOLLER, M., ANDERSSON-EKLUND, L., ANDERSSON, L., and FOSSUM, C.: Mapping quantitative trait loci for immune capacity in the pig. *J. Immunol.* 161, 829–835 (1998)
- EDWARDS, D. B., ERNST, C. W., RANEY, N. E., DOUMIT, M. E., HOGE, M. D., and BATES, R. O.: Quantitative trait locus mapping in an F-2 Duroc $\times$ Pietrain resource population: II. Carcass and meat quality traits. *J. Anim. Sci.* 86, 254–266 (2008)
- ESTELLE, J., GIL, F., VAZQUEZ, J. M., LATORRE, R., RAMIREZ, G., BARRAGAN, M. C., FOLCH, J. M., NOGUERA, J. L., TORO, M. A., and PEREZ-ENCISO, M.: A quantitative trait locus genome scan for porcine muscle fiber traits reveals overdominance and epistasis. *J. Anim. Sci.* 86, 3290–3299 (2008)
- FLICEK, P., AKEN, B. L., BALLESTER, B., BEAL, K., BRAGIN, E., BRENT, S., CHEN, Y., CLAPHAM, P., COATES, G., FAIRLEY, S., FITZGERALD, S., FERNANDEZ-BANET, J., GORDON, L., GRAF, S., HAIDER, S., HAMMOND, M., HOWE, K., JENKINSON, A., JOHNSON, N., KAHARI, A., KEEFE, D., KEENAN, S., KINSELLA, R., KOKOCINSKI, F., KOSCIELNY, G., KULESHA, E., LAWSON, D., LONGDEN, I., MASSINGHAM, T., McLAREN, W., MEGY, K., OVERDUIN, B., PRITCHARD, B., RIOS, D., RUFFIER, M., SCHUSTER, M., SLATER, G., SMEDLEY, D., SPUDICH, G., TANG, Y. A., TREVANION, S., VILELLA, A., VOGEL, J., WHITE, S., WILDER, S. P., ZADISSA, A., BIRNEY, E., CUNNINGHAM, F., DUNHAM, I., DURBIN, R., FERNANDEZ-SUAREZ, X. M., HERRERO, J., HUBBARD, T. J. P., PARKER, A., PROCTOR, G., SMITH, J., and SEARLE, S. M. J.: Ensembl's 10th year. *Nucl. Acids Res.* 38, D557–562 (2010)

- FRANK, S. A.: Genetic variation of polygenic characters and the evolution of genetic degeneracy. *J. Evol. Biol.* 16, 138–142 (2003)
- GROSSE-BRINKHAUS, C., PHATSARA, C., JONAS, E., TESFAYE, D., JÜNGST, H., THOLEN, E., and SCHELLANDER, K.: Detection of epistatic QTL for meat quality and carcass composition in a porcine Duroc × Pietrain population. In: EAAP – 60th Annual Meeting; pp. 161. Barcelona 2009
- HORSTHEMKE, B., SURANI, A., JAMES, T., and OHLSSON, R.: The mechanisms of genomic imprinting. *Results and Problems in Cell Differentiation* 25, 91–118 (1999)
- HU, Z. L., DRACHEVA, S., JANG, W. H., MAGLOTT, D., BASTIAANSEN, J., ROTHSCILD, M. F., and REECY, J. M.: A QTL resource and comparison tool for pigs: PigQTLDB. *Mamm. Genome* 16, 792–800 (2005)
- JANSEN, R. C., and NAP, J. P.: Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet.* 17, 388–391 (2001)
- JENNEN, D. G. J., BRINGS, A. D., LIU, G., JUNGST, H., THOLEN, E., JONAS, E., TESFAYE, D., SCHELLANDER, K., and PHATSARA, C.: Genetic aspects concerning drip loss and water-holding capacity of porcine meat. *J. Anim. Breed. Genet.* 124, 2–11 (2007)
- JONAS, E., SCHREINEMACHERS, H. J., KLEINWACHTER, T., UN, C., OLTMANN, I., TETZLAFF, S., JENNEN, D., TESFAYE, D., PONSUKSILI, S., MURANI, E., JUENGST, H., THOLEN, E., SCHELLANDER, K., and WIMMERS, K.: QTL for the heritable inverted teat defect in pigs. *Mamm. Genome* 19, 127–138 (2008)
- JORGENSEN, B.: Osteochondrosis/osteoarthritis and claw disorders in sows, associated with leg weakness. *Acta Veterinaria Scandinavica* 41, 123–138 (2000)
- 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. Anim. Sci.* 79, 2812–2819 (2001)
- KONING, D. J. DE, JANSS, L. L. G., RATTINK, A. P., VAN OERS, P. A. M., VRIES, B. J. DE, GROENEN, M. A. M., VAN DER POEL, J. J., GROOT, P. N. DE, BRASCAMP, E. W., and VAN ARENDONK, J. A. M.: Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics* 152, 1679–1690 (1999)
- 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)
- LAENOI, W., UDDIN, M. J., CINAR, M. U., GROSSE-BRINKHAUS, C., TESFAYE, D., JONAS, E., SCHOLZ, A. M., THOLEN, E., LOOFT, C., WIMMERS, K., PHATSARA, C., JÜNGST, H., SAUERWEIN, H., and SCHELLANDER, K.: Quantitative trait loci analysis for leg weakness and its related traits in a Duroc × Pietrain F2 resource population. *Mündliche Mitteilung*.
- LANDER, E. S., and BOTSTEIN, D.: Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185–199 (1989)
- LI, H., LU, L., MANLY, K. F., CHESLER, E. J., BAO, L., WANG, J., ZHOU, M., WILLIAMS, R. W., and CUI, Y.: Inferring gene transcriptional modulatory relations: a genetical genomics approach. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1119–1125 (2005)
- LIU, G. S., JENNEN, D. G. J., THOLEN, E., JUENGST, H., KLEINWACHTER, T., HOLKER, M., TESFAYE, D., UN, G., SCHREINEMACHERS, H. J., MURANI, E., PONSUKSILI, S., KIM, J. J., SCHELLANDER, K., and WIMMERS, K.: A genome scan reveals QTL for growth, fatness, leanness and meat quality in a Duroc-Pietrain resource population. *Anim. Genet.* 38, 241–252 (2007)
- LIU, G. S., KIM, J. J., JONAS, E., WIMMERS, K., PONSUKSILI, S., MURANI, E., PHATSARA, C., THOLEN, E., JUENGST, H., TESFAYE, D., CHEN, J. L., and SCHELLANDER, K.: Combined line-cross and half-sib QTL analysis in Duroc-Pietrain population. *Mamm. Genome* 19, 429–438 (2008)
- MALEK, M., DEKKERS, J. C. M., LEE, H. K., BAAS, T. J., PRUSA, K., HUFF-LONERGAN, E., and ROTHSCILD, M. F.: A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mamm. Genome* 12, 637–645 (2001)
- MAYER, J., and PIRCHNER, F.: Asymmetry and inverted nipples in gilts. *Archiv für Tierzucht Dummerstorf* 38, 87–91 (1995)
- MILAN, D., JEON, J.-T., LOOFT, C., AMARGER, V., ROBIC, A., THELANDER, M., ROGEL-GAILLARD, C., PAUL, S., IANNUCELLI, N., RASK, L., RONNE, H., LUNDSTRÖM, K., REINSCH, N., GELLIN, J., KALM, E., ROY, P. L., CHARDON, P., and ANDERSSON, L.: A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 288, 1248–1251 (2000)

- MILAN, D., WOLOSZYN, N., YERLE, M., LEROY, P., BONNET, M., RIQUET, J., LAHBIBMANSAIS, Y., CARITEZ, J. C., ROBIC, A., SELLIER, P., ELSÉN, J. M., and GELLIN, J.: Accurate mapping of the “acid meat” RN gene on genetic and physical maps of pig Chromosome 15. *Mamm. Genome* 7, 47–51 (1996)
- NEZER, C., MOREAU, L., BROUWERS, B., COPPIETERS, W., DETILLEUX, J., HANSET, R., KARIM, L., KVASZ, A., LE-ROY, 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)
- PONSUKSILI, S., JONAS, E., MURANI, E., PHATSARA, C., SRIKANCHAI, T., WALZ, C., SCHWERIN, M., SCHELLANDER, K., and WIMMERS, K.: Trait correlated expression combined with expression QTL analysis reveals biological pathways and candidate genes affecting water holding capacity of muscle. *BMC Genomics* 9, 367 (2008a)
- PONSUKSILI, S., MURANI, E., PHATSARA, C., JONAS, E., WALZ, C., SCHWERIN, M., SCHELLANDER, K., and WIMMERS, K.: Expression profiling of muscle reveals transcripts differentially expressed in muscle that affect water-holding capacity of pork. *J. Agricult. Food Chem.* 56, 10311–10317 (2008b)
- RAMOS, A. M., CROOLMANS, R. P. M. A., AFFARA, N. A., AMARAL, A. J., ARCHIBALD, A. L., BEEVER, J. E., BENDIXEN, C., CHURCHER, C., CLARK, R., DEHAIS, P., HANSEN, M. S., HEDEGAARD, J., HU, Z.-L., KERSTENS, H. H., LAW, A. S., MEGENS, H.-J., MILAN, D., NONNEMAN, D. J., ROHRER, G. A., ROTHCHILD, M. F., SMITH, T. P. L., SCHNABEL, R. D., VAN TASSELL, C. P., TAYLOR, J. F., WIEDMANN, R. T., SCHOOK, L. B., and GROENEN, M. A. M.: Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PLoS ONE* 4, e6524 (2009)
- ROTHSCHILD, M. F.: Porcine genomics delivers new tools and results: This little piggy did more than just go to market. *Genet. Res.* 83, 1–6 (2004)
- ROTHSCHILD, M. F., HU, Z. L., and JIANG, Z. H.: Advances in QTL mapping in pigs. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 192–197 (2007)
- SANCHEZ, M. P., RIQUET, J., IANNUCELLI, N., GOGUE, J., BILLON, Y., DEMEURE, O., CARITEZ, J. C., BURGAUD, G., FEVE, K., BONNET, M., PERY, C., LAGANT, H., LE ROY, P., BIDANEL, J. P., and MILAN, D.: Effects of quantitative trait loci on chromosomes 1, 2, 4, and 7 on growth, carcass, and meat quality traits in backcross Meishan × Large White pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 526–537 (2006)
- SATO, S., OYAMADA, Y., ATSUJI, K., NADE, T., SATO, S., KOBAYASHI, E., MITSUHASHI, T., NIRASAWA, K., KOMATSUDA, A., SAITO, Y., TERA, S., HAYASHI, T., and SUGIMOTO, Y.: Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan × Duroc F2 resource population. *J. Anim. Sci.* 81, 2938–2949 (2003)
- SOLLER, M., BRODY, T., and GENIZI, A.: Power of experimental designs for detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theoret. Appl. Genet.* 47, 35–39 (1976)
- THOMSEN, H., LEE, H. K., ROTHCHILD, M. F., MALEK, M., and DEKKERS, J. C. M.: Characterization of quantitative trait loci for growth and meat quality in a cross between commercial breeds of swine. *J. Anim. Sci.* 82, 2213–2228 (2004)
- VAN LAERE, A. S., NGUYEN, M., BRAUNSCHEWIG, 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)
- VANSTEENBERGEN, E. J.: Description and evaluation of a linear scoring system for exterior traits in pigs. *Livestock Prod. Sci.* 23, 163–181 (1989)
- WEBB, A. J., RUSSELL, W. S., and SALES, D. I.: Genetics of leg weakness in performance-tested boars. *Anim. Prod.* 36, 117–130 (1983)
- WELLER, J. I.: *Quantitative Trait Loci Analysis in Animals*. Wallingford (OX, UK), New York (NY, USA): CABI Pub. 2001
- WIESNER, E., und WILLER, S.: Problematik des Auftretens von Kratzerzitzen beim Schwein. *Monatszeitschr. Veterinärmed.* 33, 189–190 (1977)
- WIMMERS, K., FIEDLER, I., HARGE, T., MURANI, E., SCHELLANDER, K., and PONSUKSILI, S.: QTL for microstructural and biophysical muscle properties and body composition in pigs. *BMC Genetics* 7, 15 (2006)
- WIMMERS, K., JONAS, E., SCHREINEMACHERS, H. J., TESFAYE, D., PONSUKSILI, S., THOLEN, E., JUENGST, H., SCHELLANDER, K., and PHATSARA, C.: Verification of chromosomal regions affecting the innate immunity in pigs using linkage mapping. *Developm. Biol.* 132, 279–286 (2008)
- WIMMERS, K., MURANI, E., SCHELLANDER, K., and PONSUKSILI, S.: QTL for traits related to humoral immune response estimated from data of a porcine F2 resource population. *Int. J. Immunogenetics* 36, 141–151 (2009)

- YVERT, G., BREM, R. B., WHITTLE, J., AKEY, J. M., FOSS, E., SMITH, E. N., MACKELPRANG, R., and KRUGLYAK, L.: Trans-acting regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of transcription factors. *Nature Genet.* 35, 57–64 (2003)
- ZHU, M., and ZHAO, S.: Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 420–427 (2007)

Christine GROSSE-BRINKHAUS
Mehmet Ulas CINAR
Muhammad Jasim UDDIN
Prof. Dr. Karl SCHELLANDER
Institut für Tierwissenschaften
Abteilung Tierzucht und Tierhaltung
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Endenicher Allee 15
53115 Bonn
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 228 733386
Fax: +49 228 732284
E-Mail: christine.große-brinkhaus@itw.uni-bonn.de
ucin@itw.uni-bonn.de
judd@itw.uni-bonn.de
karl.schellander@itw.uni-bonn.de

Struktur und Funktion von Kandidatengen

Christoph KNORR (Göttingen)

Mit 1 Abbildung und 2 Tabellen

Zusammenfassung

Die Definition eines Gens ist seit der ersten Erwähnung zu Beginn des 20. Jahrhunderts mehrfach in Abhängigkeit vom wachsenden Kenntnisstand modifiziert worden. Es ist jedoch zweifelsfrei, dass Gene durch diejenigen DNA-Abschnitte widerspiegelt werden, die die Transkription, die Translation und die Expression bewirken und für Proteine kodieren. Primäres Ziel der Genomanalyseprojekte bei landwirtschaftlichen Nutztieren und bei Begleittieren des Menschen ist es, Gene strukturell und funktionell zu charakterisieren, die (züchterisch) wichtige Phänotypen oder Merkmale bedingen. Solche Gene werden als Kandidatengene bezeichnet. Es gelang jedoch nur in wenigen Fällen, die Funktionalität eines Kandidatengens zu beschreiben und nachzuweisen. Als Beispiele seien das porcine IGF2-Gen, das bovine SLC35A3-Gen und das canine MLPH-Gen genannt. Eine Vielzahl potentieller Kandidatengene hat sich somit trotz interdisziplinär ausgerichteter Forschungsansätze als nicht relevant für das Merkmal/den Phänotyp erwiesen. Der Hauptgrund dafür ist in der Komplexität der Merkmals(patho)physiologie und in der Schwierigkeit, adäquate Phänotypen zu erhalten, begründet. Das ENCODE-Projekt (*Encyclopedia of DNA Elements*) hat im Post-Sequenzierungszeitalter zudem nachgewiesen, dass viel mehr funktionelle Elemente in der (humanen) Genomsequenz existieren, als bisher bekannt. Somit liegen komplexere Mechanismen der Regulation und Transkription des Genoms vor. Auch die Begrifflichkeit ‚Gen‘ ist deswegen neu zu definieren: Ein Gen stellt eine Einheit genomischer Sequenzen dar, die einen zusammenhängenden Satz von potentiell überlappenden funktionalen Produkten kodiert.

Abstract

The term gene has frequently been modified since it was coined at the beginning of the 20th century. Currently, ‘gene’ refers to a discrete DNA region with major impacts on transcription, translation and expression to encode a protein. The primary goal of genome projects in livestock and companion animals has been to characterize both the structure and function of those genes that are involved with the development or physiology of a trait – the candidate genes. However, the causative sequence variant has been detected in only a few candidate genes such as the porcine *IGF2*, the bovine *SLC35A3*, and the canine *MLPH*. One apparent weakness of the candidate gene approach is the lack of sufficient well-defined phenotypes of interest. In addition, more sophisticated patterns of dispersed regulation and pervasive transcription were uncovered by the human ENCODE project (*Encyclopedia of DNA Elements*) blurring the concept of a gene. These data suggest the tentative update of the definition of a gene: a gene is a union of genomic sequences encoding a coherent set of potentially overlapping functional products.

1. Von der Domestikation zur geplanten Tierzucht

Die Domestikation, d. h. die Haustierwerdung durch Einfangen und Zähmen von Wildtieren zum Zwecke der Nutzung durch den Menschen, war der Beginn der Tierzucht. Durch sie wurde die genetische Variabilität erweitert, welche sich in charakteristischen phänotypischen Veränderungen, die Morphologie, die Physiologie und die Ethologie der Tiere betreffend,

niederschlag. Gleichzeitig, aufgrund der noch nicht erfolgten Sesshaftigkeit der Menschen und der Anpassungsfähigkeit der Tiere an unterschiedliche klimatische und geographische Regionen, kam es zur Ausbildung von Rassen (RÖHRS 1994).

Strategien einer gezielten Tierzucht lassen sich hingegen erst im 19. Jahrhundert erkennen: Es wurde begonnen, Herdbücher zu führen, die Verzeichnisse über Abstammung und Vererbung enthielten. Verschiedene Theorien über die Weitergabe von Eigenschaften an Nachkommen, wie die von der Reinheit der Rasse ausgehende Konstanztheorie (1825), oder die Individualpotenzlehre (1860), die besagt, dass die Eigenschaften des Zuchtieres selbst unabhängig von Abstammung oder Blutanteil in ihrer Durchschlagskraft zum Ausdruck kommen, wurden veröffentlicht (KÜNZI und STRANZINGER 1993).

Die entscheidenden Impulse für die Tierzucht resultierten jedoch aus der Verbreitung der Evolutionstheorie DARWINS (1859) und der Entdeckung der Vererbungsgesetze durch Gregor MENDEL im Jahre 1866, die jedoch erst mit der unabhängigen Wiederentdeckung im Jahre 1900 durch die Botaniker DE VRIES, CORRENS und TSCHERMACK (FISCHER 2003) ihre heutige Bedeutung erhielten.

2. Die Definition des eukaryotischen Gens im Wandel der Zeiten

Im Jahre 1906 wurde vom englischen Wissenschaftler William BATESON, der die Mendelschen Gesetze auf Haustiere übertrug und deren Allgemeingültigkeit feststellte, in einer persönlichen Kommunikation das Adjektiv ‚genetisch‘ und das Substantiv ‚Genetik‘ geprägt. Dies erfolgte in der Voraussicht, dass eine Wissenschaft der Vererbung bzw. die der Weitergabe von Erbelementen entstehen würde. MENDEL selbst führte die von ihm beobachteten Merkmalsunterschiede, die er in seinen Kreuzungsexperimenten bei Pflanzen nachwies, auf Differenzen in der Beschaffenheit eben solcher Erbelemente zurück, vermied aber eine weitere Definition (FISCHER 2001). Die Begrifflichkeit Gen war somit noch nicht geprägt, sondern wurde im Folgenden im Jahre 1909 von dem Botaniker Wilhelm JOHANNSON postuliert, um den durch die Mendelschen Experimente nachgewiesenen, aber noch unbekannten Elementen der Vererbung einen Namen zu geben. Mit dem Namen Gen wurde jedoch wiederum keine detaillierte Begrifflichkeit assoziiert. JOHANNSON verwies vielmehr darauf, dass der Begriff Gen ohne Hypothese geprägt sei und als Rechnungseinheit verwendet werden solle, ohne dass man sich darunter ein morphologisches bzw. physikalisches Gebilde vorstellen dürfe (FISCHER 2003).

Die zunehmende Kenntnis über den Aufbau der Erbinformation im letzten Jahrhundert führte aber graduell zu verschiedenartigen Verfeinerungen des Begriffs Gen (PEARSON 2006, GERSTEIN et al. 2007), die davon geprägt sind, dass es eine definierte Struktur eines Gens gibt, der eine biologische Funktion zugeordnet werden kann. So wurde in der klassischen Genetik ein Gen abstrakt als die Vererbungseinheit betrachtet, die eine Eigenschaft der Eltern auf die Nachkommen überführt. Aufgrund der wachsenden biochemischen Kenntnisse wurde festgestellt, dass Enzyme und Proteine die Eigenschaften bewirken und ein spezifisches Gen für ein spezifisches Enzym bzw. Protein verantwortlich ist (‚Ein-Gen-Ein-Enzym-Hypothese‘ von BEADLE und TATUM aus dem Jahre 1941). Die Molekulargenetik schließlich führte zu der morphologischen bzw. physikalischen Definition eines Eukaryoten-Gens, das DNA-Sequenzen, die als einzelne, unterscheidbare und lokalisierte ‚Kügelchen‘ auf den Chromosomen erscheinen, aufgrund der kodierenden (Exons) und nicht-kodierenden (Introns) Bereiche in

translatierbare mRNA-Sequenzen (Strukturgenen) umgeschrieben (transkribiert) werden, die dann stückweise zu den Proteinen zusammengesetzt werden. Vervollständigt wird die Struktur dieser primären Transkriptionseinheit durch regulatorische DNA-Abschnitte, die im 5'- und 3'-Bereich gelegen sind und die Kontrollelemente (wie z. B. Enhancer und Promotor) für die Genexpression beinhalten. Diese Blaupause diente der Annotation proteinkodierender Gene im Zeitalter der Sequenzierungsprojekte (PEARSON 2006).

3. Vom Gen zum Kandidatengen

Die Sequenzierungsprojekte des letzten Jahrzehnts des 20. Jahrhunderts zielten primär darauf ab, die speziesspezifischen Basenabfolgen der DNA zu erhalten. Ausgehend davon sollten proteinkodierende Gene identifiziert werden, um den Aufbau, die Kontrollmechanismen und die Evolution von Genomen zu beschreiben.

Im Jahre 2001 wurden zeitgleich zwei unabhängige Versionen des humanen Genoms in den Zeitschriften *Nature* und *Science* veröffentlicht. Im Projekt unter der Führung der Firma *Celera Genomics* gaben VENTER et al. (2001) 39 114 hypothetische und annotierte Gene an. Im zweiten Projekt – das vom *National Institute of Health der Vereinigten Staaten von Amerika* koordiniert wurde – wurden von LANDER et al. (2001) mit dem Verweis auf vorhandene analytische Ungenauigkeiten 31 778 bekannte und vermutete Gene postuliert. Beide Zahlen liegen jedoch deutlich niedriger als die vorherigen Schätzungen von bis zu 140 000 Genen, die kursierten (LIANG et al. 2000). Gegenwärtig werden 20 111 humane proteinkodierende Gene postuliert (<http://www.vega.sanger.ac.uk>; 39. Release). Ähnliche Zahlen von Genen sind für die bisher sequenzierten Genome landwirtschaftlicher Nutztiere und auch für die bekannten Genome von Begleittieren des Menschen ermittelt worden (Tab. 1).

Tab. 1 Anzahl annotierter Gene für Genome landwirtschaftlicher Nutztiere und für Genome von Begleittieren des Menschen

Spezies	Annotierte Gene	Referenz
<i>Bos taurus</i>	22 000	<i>The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium</i> 2009
<i>Gallus gallus</i>	20 000–23 000	<i>International Chicken Genome Sequencing Consortium</i> 2004
<i>Equus caballus</i>	20 322	WADE et al. 2009
<i>Canis familiaris</i>	19 300	LINDBLAH-TOH et al. 2005

Im besonderen Fokus der Genomforschung steht jedoch die Charakterisierung von Kandidatengen, also solchen Genen, deren (1.) biologische Funktionen *per definitionem* bekannt sind, die (2.) sowohl Strukturgene oder aber Gene in einem Stoffwechselprozess sind und die (3.) einen signifikanten Anteil der phänotypischen Varianz der Merkmalsausprägung erklären (ROTHSCHILD und SOLLER 1997). Als Herangehensweisen, um Kandidatengene zu identifizieren, werden der funktionelle Ansatz – auch *educated guess* genannt – und der positionelle Ansatz unterschieden und durchgeführt. Beim funktionellen Ansatz wird ein Gen durch seine bekannte biologische Funktion zu einem Kandidatengen für ein Merkmal bzw. einen Phänotyp. Beim positionellen Ansatz werden anhand der Analyse von DNA-Markern an einer geeigneten Untersuchungsgruppe mit dem Merkmal assoziierte Chromosomenabschnitte iden-

tifiziert, in denen dann – z. B. aufgrund der vergleichenden Genkarten – auf Kandidatengene geschlossen werden kann (COLLINS 1992).

Speziesübergreifend bei landwirtschaftlichen Nutztieren sind dadurch in der Zwischenzeit verschiedene Kandidatengene beschrieben worden, die kausal für monogen determinierte Gendefekte bzw. Erkrankungen und für Merkmale sind, die nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden, wie beispielsweise die Fellfarbe. Es wurden ebenso Kandidatengene für polygen bedingte Eigenschaften (komplex vererbte Merkmale oder auch *quantitative traits*), wie Merkmale der Milchleistung, des Wachstums, der Schlachtkörperzusammensetzung, der Fleischqualität, der Fruchtbarkeit sowie des Wollwachstums und der Stressempfindlichkeit identifiziert und beschrieben. In Tabelle 2 sind drei ausgewählte Kandidatengene mit den kausalen Sequenzvarianten und deren Effekten auf die Genorganisation und Stoffwechselaktivität sowie den Phänotyp vorgestellt. Die Lokalisation der kausalen Sequenzvarianten ist dabei in einem Exon (*SLC35A3*), in einer Splicesite (*MLPH*) oder aber innerhalb eines Introns (*IGF2*). Es ist ersichtlich, dass kausale Sequenzvarianten nicht nur in den Exons eines Gens auftreten, sondern auch in regulatorischen Genbereichen. Diese ausgewählten Studien bestätigen die visionäre Vermutung von KING und WILSON aus dem Jahre 1975, die eben meinten, dass die Mehrzahl der verantwortlichen Sequenzvarianten in den regulatorischen Genabschnitten zu finden sind und nicht in den Abschnitten, die für die Struktur des Proteins verantwortlich sind (KING und WILSON 1975). Es kann daher gefolgert werden, dass es keine allgemein gültigen Eigenschaften bzw. Kriterien gibt, die es erlauben, vereinheitlichend eine strukturelle oder funktionelle Definition eines Kandidatengens zu geben.

4. Warum gibt es so viele Kandidatengene und so wenig ursächlich verantwortliche Gene?

Eine eigene Literaturrecherche (Stand März 2010) im *ISI Web of Knowledge* (<http://apps.isiknowledge.com>) ergab, dass 6398 Publikationsüberschriften aus verschiedenen Disziplinen der Lebenswissenschaften den Ausdruck *candidate gene* enthielten. Die Anzahl derartiger Veröffentlichungen ist stetig seit den 1990er Jahren angestiegen. Bei 255 Manuskripten ist jedoch schon durch das Wort *exclusion* im Titel ersichtlich, dass sich das untersuchte Gen schließlich nicht als das verantwortliche Gen herausstellte. Wie viele der propagierten Kandidatengene nun wirklich verantwortlich für das untersuchte Merkmal/den untersuchten Phänotyp sind, ist unklar. Die geringe Anzahl an gendiagnostischen Testverfahren indiziert jedoch, dass die Anzahl überschaubar ist und diese vornehmlich für monogene Gendefekte und andere nach den Mendelschen Gesetzen vererbte qualitative Eigenschaften bekannt sind. Betrachtet man hingegen die polygen vererbten Merkmale bei landwirtschaftlichen Nutztieren, so sind in lediglich drei Fällen (das sind das porcine IGF2-Gen, das bovine DGAT-Gen und das caprine GDF8-Gen) die verantwortlichen Sequenzvarianten in Genen charakterisiert worden, die in den kartierten Quantitative-Trait-Loci (QTL)-Regionen liegen (RON und WELLER 2007).

Als erste Ursache der niedrigen Erfolgsrate wird die begrenzte Anzahl an verfügbaren Phänotypen angesehen und die Schwierigkeit des Nachweises, dass die vermutlich verantwortliche Sequenzvariante tatsächlich zu einem veränderten Phänotyp führt (GLAZIER et al. 2002). RON und WELLER (2007) stellen daher vier Forderungen auf, die Kandidatengene für (quantitative) Merkmale gleichzeitig erfüllen sollen:

Tab. 2. Ausgewählte Kandidatengene mit Effekten der kausalen Sequenzvariante¹

Genname (Abkürzung)	Spezies/Rasse	Sequenzvariante und Position ²	Allele	Effekte der Variation auf Genorganisation und Stoffwechselaktivität	Phänotyp	Referenz
<i>Solute carrier family 35A3-Gen (SLC35A3)</i>	Rind/Holstein- Friesian	G > T 559	wt = G mt = T	TT-Genotypen – gestörte Proteinglykosy- lierung – abnormaler Zuckertransport in den Golgi-Apparat – Position 180: Aminosäuren- substitution (Valin zu Phenyl- alanin)	<i>Complex Vertebral Malformation</i> (CVM) – Totgeburten – Hals- und Nacken- wirbel verkürzt – Fehlstellungen der Gliedmaßen – verminderte Geburtsgewichte	AGERHOLM et al. 2001; THOMSEN et al. 2006
Melanophillin- Gen (<i>MLPH</i>)	Hund/Pinscher	c.-22G > A (letztes nt im untranslatierten Exon 1)	wt = G mt = A	AA-Genotypen – ca. 25 % weniger <i>MLPH</i> - Transkripte – Verlust der Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor SF2/ASF – achtfach herabgesetzte Splicingeffizienz	Farbverdünnung des Fells (<i>Dilute</i> ‘)	PHILIPP et al. 2005; DRÖGEMÜLLER et al. 2007
<i>Insulin-like growth factor 2 (IGF2)</i>	Schwein	G > A (Intron 3, <i>Position -3072</i>)	wt = G mt = A	AA-Genotypen – Mutation verhindert Interaktion mit Kernfaktor (Repressor) – dreifach erhöhte Expression der IGF2-mRNA im post- natalen Muskel – paternales Imprinting	%-Anteil der <i>phänotypischen</i> Varianz – Muskelmasse (ca. 15–30 %) – Rückenspeck (ca. 10–20 %)	JEON et al. 1999; NEZER et al. 1999; VAN LAERE et al. 2003

¹ Wildtyp-Allel (wt), Kausale Variante (mt)² Positionsangaben übernommen von THOMSEN et al. (2006), DRÖGEMÜLLER et al. (2007) und VAN LAERE et al. (2003)

- Vom Gen geht ein bekannter (patho)physiologischer Effekt für die Ausprägung des Merkmals bzw. des Phänotyps aus.
- Der Effekt des Gens auf das Merkmal bzw. den Phänotyp wurde in anderen Spezies durch *Knock-outs*, *Knock-ins*, transgene oder mutante Individuen nachgewiesen.
- Das Gen ist präferentiell in Organen, die mit dem Merkmal bzw. dem Phänotyp in Verbindung stehen, exprimiert.
- Die präferentielle Expression des Gens erfolgt in Entwicklungsstadien, die mit dem Merkmal bzw. dem Phänotyp in Verbindung stehen.

Im Gegensatz zu Modelltieren oder Pflanzen lassen sich jedoch bei landwirtschaftlichen Nutztieren Phänotypen kaum durch experimentelle Inzuchtlinien, durch die Erstellung von *Knock-ins* bzw. *Knock-outs* (Transgene) oder gar durch die Klonierung von Individuen durch Kernttransfer in ausreichender Menge erstellen. Abgesehen von den limitierten Erfolgsaussichten dieser Techniken (z. B. THOMSON und MCWHIR 2004, SCHREINER 2005), sind ferner noch die Kosten für die Tierhaltung zu berücksichtigen ebenso wie die langen Generationsintervalle landwirtschaftlicher Nutztiere (RON und WELLER 2007). Die Sichtung, Erfassung und Sammlung von zahlreichen aussagefähigen und verlässlichen (dazu zählt auch die korrekte Abstammung) Phänotypen in Feldpopulationen ist trotz entsprechender Organisation aufgrund des hohen finanziellen und personellen Aufwandes ebenso lediglich eingeschränkt möglich. Letztendlich gestaltet sich die systematische Gewinnung von Phänotypen speziell für komplexe Merkmale sehr schwierig. Verdeutlicht sei dies im Folgenden am Beispiel des Erbdefekts der porzinen *Hernia inguinalis/scrotalis*.

5. Die Phänotypenerfassung am Beispiel der porzinen *Hernia inguinalis/scrotalis*

Unter einer Hernie bzw. einem Bruch versteht man das Vortreten von Eingeweiden aus der Bauchhöhle in eine abnorme Ausstülpung des parietalen Bauchfells. Als *Hernia inguinalis* wird der Vorfall von Eingeweiden, meist Teilen des Dünndarms und des großen Netzes, in den Leistenkanal bezeichnet. Ein Hodensackbruch (*Hernia scrotalis*) liegt dann vor, wenn die Eingeweide in den Hodensack eintreten (WALDMANN und PLONAIT 1997). *Hernia inguinalis* und *scrotalis* zählen zu den angeborenen Anomalien beim Schwein und bewirken trotz geringer vorkommender Häufigkeiten von etwa 1 % bei allen Neugeborenen nachhaltige wirtschaftliche Schäden durch mögliche Tierarztkosten bzw. durch den Ausfall betroffener Individuen als Zucht- oder Masttiere.

Als Ursache für die Hernien gelten Störungen während des Hodenabstieges (*Descensus testis*). Dessen physiologischer Ablauf ist in Abbildung 1 dargestellt. Der Hodenabstieg kann aufgrund von anatomischen, physiologischen sowie hormonellen Effekten und Veränderungen in mehrere Phasen unterteilt werden (WENSING 1986, HUTSON et al. 1997). Die Einteilung des Hodenabstieges in eine *transabdominale* und in eine *inguinoscrotale* Phase stellt jedoch eine einfachere Unterteilung dar (HUTSON et al. 2004). Die transabdominale Phase umfasst alle Vorgänge der Wanderung der Hoden von ihrer Ausgangslage durch die Bauchhöhle bis zum Inguinalring hin, während die *inguino-scrotale* Phase den Durchtritt der Hoden durch den Leistenkanal und deren Bewegung innerhalb des Scrotums beschreibt. Der Hodenabstieg beim Schwein ist zum Zeitpunkt der Geburt vollzogen.

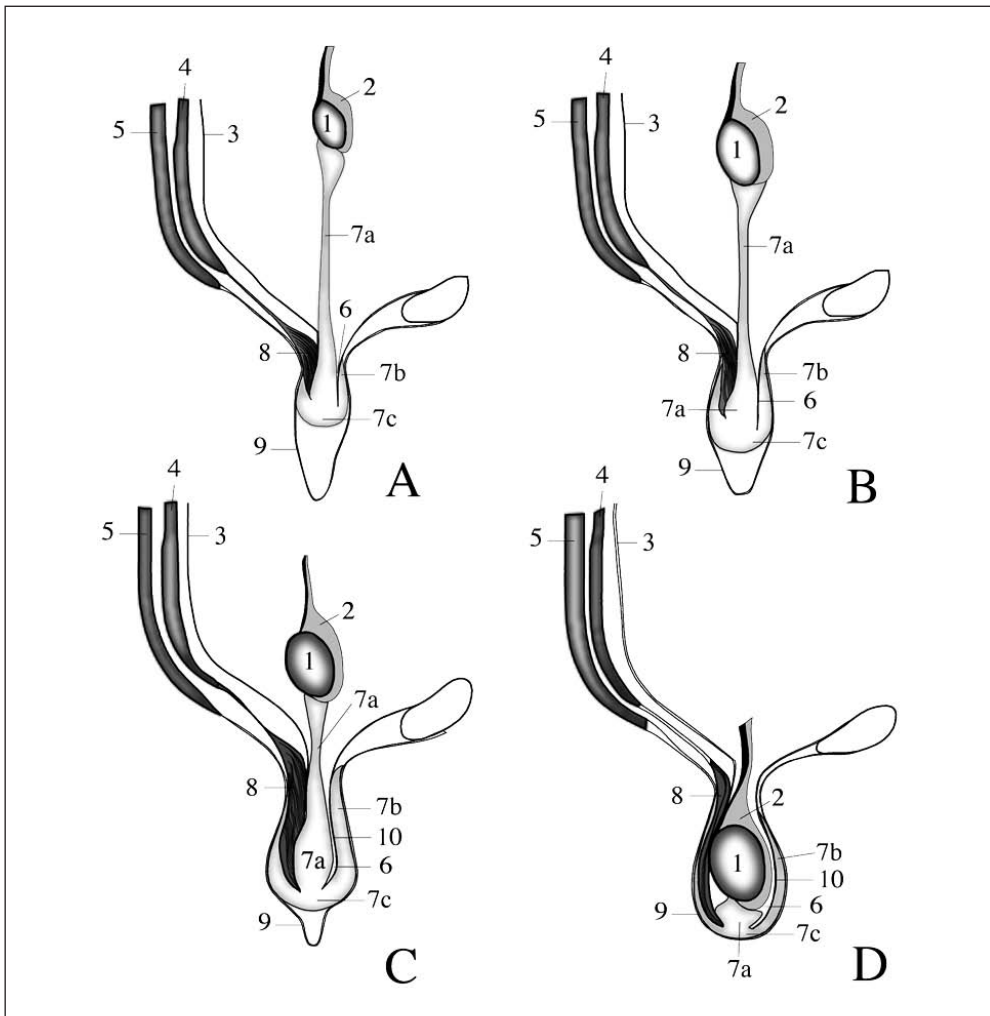


Abb. 1 *Descensus testis* beim Schwein (modifiziert nach WENSING 1986). (A) Entwicklung am Tag 65 *post conceptionem* (p. c.); (B) 75 Tage p. c.; (C) 85–90 Tage p. c.; (D) bei der Geburt. 1 Hoden, 2 Nebenhoden, 3 parietales Blatt des Bauchfells, 4 innerer schiefer Bauchmuskel, 5 äußerer schiefer Bauchmuskel, 6 Scheidenhautfortsatz, 7a Gubernaculum proper, 7b vaginaler Teil des Gubernaculums, 7c infravaginaler Teil, 8 Hodenheber, 9 Fascia spermatica, 10 Tunica vaginalis.

Die anatomische Schlüsselstruktur ist das Gubernaculum testis (Hodenleitband). Die Gonadenanlagen sind zunächst indifferent in der Urogenitalfalte angelegt und differenzieren sich während der fetalen Entwicklungsphase der Frucht in Hoden oder Ovarien aus. Bei einem männlichen Individuum regressiert zu diesem Zeitpunkt das kraniale Keimdrüsenband, während sich das kaudale Keimdrüsenband vergrößert und zum Gubernaculum entwickelt. Vor dem beginnenden Hodenabstieg differenziert sich das Gubernaculum in das Gubernaculum proper (7a), in einen vaginalen Teil (7b) und in einen infravaginalen Teil (7c) (Sektionen A–C der Abb. 1). Kurz vor und während des *Descensus testis*, der etwa am Tag 80 bis 90 der Gestation erfolgt

(HEYNS und DE KLERK 1985, FENTENER VAN VLISSINGEN et al. 1989, HEYNS et al. 1989), beginnt ein starkes Größenwachstum des extra-abdominalen Teils des Gubernaculum proper. Das Größenwachstum des Gubernaculums wird durch Wassereinlagerung bewirkt (HEYNS und DE KLERK 1985, HEYNS et al. 1990). Durch gleichzeitige Verkürzung des intra-abdominalen Bereichs des Gubernaculum proper werden die Hoden an den Leistenkanal hingeführt (WENSING 1986) (Sektionen *B* und *C* der Abb. 1). Der Durchtritt der Hoden durch den Leistenkanal in das Scrotum wird an der Position der Insertion des Gubernaculums in das Bauchfell (3) durch Bildung einer sackförmigen Ausstülpung (Scheidenhautfortsatz oder Processus vaginalis, 6) in den Hodensack, unterstützt. Der Hoden gleitet dabei in den Processus vaginalis. Die Ausformung des Processus vaginalis und die des Hodenhebers (Musculus cremaster, 8) beginnt während des Größenwachstums des Gubernaculums und ist nach erfolgten Descensus testis abgeschlossen (Sektionen *B–D* der Abb. 1). Beim Gang der Hoden durch den Leistenkanal weitet das größenveränderte und angeschwollene Gubernaculum den Leistenkanal im Bereich zwischen innerem und äußerem Inguinalring extrem. Das Gubernaculum beginnt aber schon während der Passage durch den Leistenkanal abzuschwellen. Nach Positionierung der Hoden im Skrotum schließt sich der Processus vaginalis und schnürt sich nach Verödung von der Bauchhöhle ab, während sich das Gubernaculum zum Hodenbändchen zurückbildet (HUTSON et al. 1997, 2004).

Porzine Hernien sind sicherlich ein Beispiel einer sehr komplexen Merkmalsentstehung. Die Physiologie des Descensus testis zeigt, dass getrennt oder zusammen Störungen der Geschlechtsdeterminierung einschließlich der hormonellen Steuerung, der Struktur der extrazellulären Matrix, der Größenveränderung des Gubernaculums und des Verschlusses des Processus vaginalis potentiell zum Phänotyp *Hernia inguinalis* bzw. *scrotalis* führen. Mit ca. 35 Tagen (gemessen vom Beginn des Hodenabstiegs am Tag 80 p. c. bis zur Geburt) liegt ein ausgedehnter Zeitraum für die potentielle Phänotypenentstehung vor. Die Phänotypen *Hernia inguinalis* bzw. *scrotalis* selbst sind pathogene Formen des männlichen Geschlechts/Phänotyps, welcher erst nach der Geburt für den jeweiligen Ferkelfötus bestimmbar ist und der sich letztlich während der Trächtigkeit geschützt im mütterlichen Organismus entwickelt. Genetische Studien können sich daher lediglich posterior die Phänotypen nach der Geburt zu Nutze machen und nicht zum Zeitpunkt der Entstehung ansetzen. Mögliche Untersuchungen zur Expression eines potentiellen Kandidatengens sind erst nach Klärung des verantwortlichen Entwicklungszeitpunktes und des optimalen Zielgewebes möglich. Erschwerend kommt dazu, dass Gewebe Zellverbände darstellen. Beim Säuger geht man von etwa 205 Zellarten aus (MÜLLER und HASSEL 2006) und davon, dass geschätzte 15 % aller speziesspezifischen Gene in einer individuellen Zelle zum jeweiligen Betrachtungs- bzw. Untersuchungszeitpunkt exprimiert werden (LIANG und PARDEE 1992).

6. Der Genbegriff im Post-Sequenzierungszeitalter, oder Zuwachs der Komplexität durch Wissen

Die morphologisch ausgerichtete Definition des Aufbaus eines Gens konnte einige aufgetretene molekulargenetische Phänomene nicht klären (GERSTEIN et al. 2007). Mit dem Konzept gelang es z. B. nicht, überlappende (d. h. solche Gene, die sich auf die identische DNA-Sequenz gründen, aber unterschiedliche Leseraster vorweisen oder vom Gegenstrang abgelesen werden), intronische (d. h. ein Gen existiert im Intron eines weiteren Gens) und springende Gene (Transposons, d. h. mobile genetische Elemente, die im Verlauf der Individualentwicklung eines Organismus ihren Ort im Genom wechseln können) sowie Pseudogene (vorkommende funktionslose Gene in

Eukaryoten) zu erklären. Gleiches gilt für Trans-splicing-Ereignisse (Ligation von unterschiedlichen mRNA-Molekülen des gleichen Gens, des Gegenstranges oder verschiedener Chromosomen) sowie epigenetische Effekte und Effekte der Chromatinstruktur auf den Phänotyp.

Es erwuchs aus den Daten des Humangenomprojektes die Erkenntnis, dass es differenziertere Signalsysteme als die bekannten geben muss, die für die Aufrechterhaltung des biologischen Gleichgewichts verantwortlich sind. Ein erstes Projekt, welches die Transkriptionsaktivität auf den humanen Chromosomen 21 und 22 untersuchte, fand um eine Zehnerpotenz mehr Transkripte vor, als dies von den annotierten und vermuteten Exons zu erwarten war (KAPRANOV et al. 2002). Somit entstand das ENCODE-Projekt (*Encyclopedia of DNA Elements*), um alle funktionellen Elemente im humanen Genom zu identifizieren, zu zählen und zu katalogisieren (*The ENCODE Project Consortium* 2007). Es wurden dafür 44 Genomregionen mit u. a. unterschiedlicher Gendichte, die etwa 30 Megabasen des Genoms (entspricht 1 %) abdeckten, betrachtet (WEINSTOCK 2007). Die Analyse der RNA-Moleküle erfolgte durch den Einsatz von sequenzbasierten Methoden wie den 3'-Ansatz SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), den 5'-Ansatz CAGE (*Cap Analysis of Gene Expression*) oder PETs (*Paired-End di Tags*) auch unter Nutzung innovativer Technologie wie dem MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*) (z. B. JONGENEEL et al. 2005, KAPRANOV et al. 2007, *The ENCODE Project Consortium* 2007). Der zweite Ansatzpunkt waren die hybridisierungsbasierten Techniken wie die *Tiling-Arrays* (z. B. BERTONE et al. 2004, KAPRANOV et al. 2007, *The ENCODE Project Consortium* 2007).

Die wichtigsten Ergebnisse des ENCODE-Projektes lassen sich wie folgt zusammenfassen (*The ENCODE Project Consortium* 2007, ZHANG et al. 2007, GINGERAS 2007, KAPRANOV et al. 2007):

- Das Genom ist allumfassend transkribiert. Fast das ganze Genom ist durch primäre Transkripte repräsentiert.
- Diese Transkripte überlappen und enthalten neben den Exons auch nicht-kodierende Regionen. Identische genomische Abschnitte werden mehrfach verwendet. Überlappende Transkripte können von beiden Einzelsträngen stammen.
- Es sind zusammengesetzte Transkripte gefunden worden, die aus Sequenzen bestehen, die physikalisch Hunderte von Kilobasenpaaren voneinander getrennt annotiert wurden.
- Die Definition intergenischer Bereiche ist nicht mehr gerechtfertigt, da Transkripte auch aus diesen Regionen stammen.
- Eine Vielzahl der Transkripte kodiert nicht für Proteine und wurde daher als nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) bezeichnet. Dieser Ausdruck wird als Konsequenz des ENCODE-Projektes aber nun nur für diejenigen Transkripte verwendet, von denen bekannt ist, dass sie kleine Proteine bzw. Peptide kodieren und somit eine nachgewiesene Funktion haben wie die Genregulation, die Genprozessierung und die Proteinsynthese. Als ncRNAs werden somit die ribosomale RNA (rRNA), die Transfer-RNA (tRNA), die *small-nuclear*-RNA (snRNA), die Antisense-RNA, die *small-nucleolar*-RNA (sno RNA), die *micro*-RNA (miRNA) und die *Piwi-interacting*-RNA (piRNA) definiert und subsumiert. Für die übrigen Transkripte findet der Ausdruck TUF (*Transcript of Unknown Function*) Verwendung.
- Eine große Menge bisher unbekannter Transkriptionsstartsites (TSS) wurde beschrieben. Viele von diesen ähneln bezüglich des Chromatinaufbaus und der sequenzspezifischen Proteinbindungseigenschaften denen gut beschriebener Promotoren. Regulatorische Sequenzen um die TSS sind gleichmäßig verteilt und zeigen keine Tendenz für gen-aufwärts gelegene Regionen.

- Für viele bekannte proteinkodierende Gene wurden alternative TSS gefunden, die teilweise mehr als 100 Kilobasenpaare stromaufwärts der bekannten TSS liegen.
- Die regulatorischen Elemente eines definierten Gens liegen nicht notwendigerweise direkt stromaufwärts, sondern durchaus weit entfernt auf dem Chromosom, auch näher zu einem anderen Gen. Die regulatorischen Elemente sind sowohl an den Start- wie auch Endpunkten der Transkription zu finden. Sie kommen geclustert in regulatorisch-reichen (Inseln = Island) und regulatorisch-armen Regionen (Wüsten = Desert) vor.
- Es liegen Muster der Chromatinzugänglichkeit und Modifikation von Histonen vor, die zur Vorhersage und Abschätzung der Aktivität von TSS genutzt werden können.

Die unmittelbare Konsequenz des ENCODE-Projekts ist eine Neuerung des Genbegriffs. Man spricht nun eher von Funktionseinheiten. GERSTEIN et al. (2007) propagieren eine nach ihren eigenen Worten provisorische Neudefinition des Genbegriffs: „Ein Gen stellt eine Einheit genomischer Sequenzen dar, die einen zusammenhängenden Satz von potentiell überlappenden funktionalen Produkten kodiert.“ Diese neue Definition ähnelt stark JOHANNSSONS Vorstellungen von einem Gen.

Die Erkenntnisse aus dem ENCODE-Projekt können als zweiter Erklärungsansatz neben den benötigten Phänotypen dienen, um die niedrige Anzahl von gefundenen merkmalsverursachenden Genen oder aber bestätigten Kandidatengen zu erklären.

7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Sequenzierungsprojekte haben zu einer Wissens- und Datenexplosion geführt. Es gelang, merkmalsverantwortliche Gene zu identifizieren und zu charakterisieren. Vielfach sind jedoch die genetischen Ursachen unbekannt. Das liegt einmal daran, dass exakte und differenzierte Phänotypen nicht in ausreichender Menge vorliegen oder generiert werden können. Daneben reflektieren Genome eine viel größere Komplexität als vermutet – wie im humanen ENCODE-Projekt gezeigt – was die Aufklärung der verantwortlichen genetischen Ursachen erschwert. Das menschliche Genom und somit auch das anderer Säuger muss als Kontinuum ohne definierte Grenzen zwischen DNA-Abschnitten angesehen werden, und es wird die Frage sein, inwieweit die Begriffe Gen und Kandidatengen noch nützlich sind.

Das ENCODE-Projekt wird auch als ‚Biology’s Big Bang‘ bezeichnet (THEN 2008) mit weitreichenden biologischen und ökonomischen Konsequenzen:

- Die Grundfeste der Biotechnologie-Branche war die Reduktion auf die Annahme, dass Gene unabhängig voneinander funktionieren und somit manipulierbar und herstellbar sind. Kombinationen und Wechselwirkungen in einem Lebewesen sind vernachlässigt worden.
- Die Diskussion über die Sinnhaftigkeit von Patenten auf Gene ist eine ethische. Patente auf Gene basieren jedoch auf deren eindeutigen Effekten bzw. Funktionen.
- Die sogenannte Junk-DNA (also diejenigen DNA-Abschnitte, die nicht für Proteine kodieren und zumeist als funktionsloser ‚Schrott‘ der Evolution betrachtet wurden) hat eine Bedeutung! So wie Craig VENTER Patente auf kodierende DNA-Bereiche anmeldete, sicherte sich ein anderer Wissenschaftler, Malcom SIMONS, Patente auf die Junk-DNA.

Die Mechanismen der Vererbung sind auch weiterhin nicht vollständig geklärt. Von der Übersetzung der DNA-Informationen in Proteine in Analogie zu dem bisherigen Genbegriff sind etwa 2–3 % der DNA betroffen. Das ENCODE-Projekt lässt ein sehr viel feiner agierendes

Regulationssystem bei Säugern vermuten, und die Forschungsansätze, die Bedeutung der Epigenetik zu ergründen, sind noch am Anfang. Auch dadurch ist zu erwarten, dass der Genbegriff dezidiert genutzt werden muss.

Literatur

- AGERHOLM, J. S., BENDIXEN, C., ANDERSEN, O., and ARNBERG, J.: Complex vertebral malformations in Holstein calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* **13**, 283–289 (2001)
- BERTONE, P., STOLC, V., ROYCE, T. E., ROZOWSKY, J. S., URBAN, A. E., ZHU, X., RINN, J. L., TONGPRASIT, W., SAMANTA, M., WEISSMAN, S., GERSTEIN, M., and SCHNEIDER, M.: Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science* **306**, 2242–2246 (2004)
- COLLINS, F. S.: Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nature Genet.* **1**, 3–6 (1992)
- DRÖGEMÜLLER, C., PHILIPP, U., HAASE, B., GÜNZEL-APEL, A.-R., and LEEB, T.: A noncoding melanophilin gene (MLPH) SNP at the splice donor of exon I represents a candidate causal mutation for coat color dilution in dogs. *J. Hered.* **98**, 468–473 (2007)
- FENTENER VAN VLISSINGEN, J. M., KOCH, C. A., DELPECH, B., and WENSING, C. J.: Growth and differentiation of the gubernaculum testis during testicular descent in the pig: changes in the extracellular matrix, DNA content, and hyaluronidase, beta-glucuronidase, and beta-N-acetylglucosaminidase activities. *J. Urol.* **142**, 837–845 (1989)
- FISCHER, E. P.: Das genetische Abenteuer. 1. Aufl. Düsseldorf: My Favourite Book 2001
- FISCHER, E. P.: Geschichte des Gens. 1. Aufl. Frankfurt (Main): Fischer Taschenbuchverlag 2003
- GERSTEIN, M. B., BRUCE, C., ROZOWSKY, J. S., ZHENG, D., DU, J., KORBEL, J. O., EMANUELSSON, O., ZHANG, Z. D., WEISSMAN, S., and SNYDER, M.: What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res.* **17**, 669–681 (2007)
- GINGERAS, T. R.: Origin of phenotypes: Genes and transcripts. *Genome Res.* **17**, 682–690 (2007)
- GLAZIER, A. M., NADEAU, J. H., and AITMAN, T. J.: Finding genes that underlie complex traits. *Science* **298**, 2345–2349 (2002)
- HEYNS, C. F., and KLERK, D. P. DE: The gubernaculum during testicular descent in the pig fetus. *J. Urol.* **133**, 694–699 (1985)
- HEYNS, C. F., HUMAN, H. J., and WERELY, C. J.: The collagen content of the gubernaculum during testicular descent in the pig fetus. *J. Anat.* **167**, 161–166 (1989)
- HEYNS, C. F., HUMAN, H. J., WERELY, C. J., and KLERK, D. P. DE: The glycosaminoglycans of the gubernaculum during testicular descent in the fetus. *J. Urol.* **143**, 612–617 (1990)
- HUTSON, J. M., HASTHORPE, S., and HEYNS, C. F.: Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr. Rev.* **18**, 259–280 (1997)
- HUTSON, J. M., SASAKI, Y., HUYNH, J., YONG, E., and TING, A.: The gubernaculum in testicular descent and cryptorchidism. *Turk. J. Pediatr.* **46** (Suppl.), 3–6 (2004)
- International Chicken Genome Sequencing Consortium*: Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* **432**, 695–716 (2004)
- 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)
- JONGENEEL, C. V., DELORENZI, M., ISEL, C., ZHOU, D., HAUDENSCHILD, C. D., KHREBTUKOVA, I., KUZNETSOV, D., STEVENSON, B. J., STRAUSBERG, R. L., SIMPSON, A. J. G., and VASICEK, T. J.: An atlas of human gene expression from massively parallel signature sequencing (MPSS). *Genome Res.* **15**, 1007–1014 (2005)
- KAPRANOV, P., CAWLEY, S. E., DRENKOW, J., BEKIRANOV, S., STRAUSBERG, R. L., FODOR, S. P. A., and GINGERAS, T. R.: Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science* **296**, 916–919 (2002)
- KAPRANOV, P., WILLINGHAM, A. T., and GINGERAS, T. R.: Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nature Rev. Genet.* **8**, 413–423 (2007)
- KING, M.-C., and WILSON, A. C.: Evolution at two levels in humans and chimpanzees. Their macromolecules are so alike that regulatory mutations may account for their biological differences. *Science* **188**, 107–116 (1975)
- KÜNZI, N., and STRANZINGER, G. (Eds.): Allgemeine Tierzucht. 1. Aufl. Stuttgart: Eugen Ulmer 1993
- LANDER, E. S., et al. (*International Human Genome Sequencing Consortium*): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001)
- LIANG, F., HOLT, I., PERTEA, G., KARAMYCHEVA, S., SALZBERG, S. L., and QUACKENBUSH, J.: Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nature Genet.* **25**, 239–240 (2000)

- LIANG, P., and PARDEE, A. B.: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967–971 (1992)
- LINDBLAH-TOH, K., et al.: Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803–819 (2005)
- MÜLLER, W. A., und HASSEL, M. (Eds.): *Entwicklungsbiologie*. 4. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 2006
- 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)
- PEARSON, H.: What is a gene? *Nature* 441, 398–401 (2006)
- PHILIPP, U., HAMANN, H., MECKLENBURG, L., NISHINO, S., MIGNOT, E., GÜNZEL-APEL, A.-R., SCHMUTZ, S. M., and LEEB, T.: Polymorphisms within the canine MLPH gene are associated with dilute coat color in dogs. *BMC Genet.* 6, 34 (2005)
- RON, M., and WELLER, J. I.: From QTL to QTN identification in livestock – winning by points rather than knock-out: a review. *Anim. Genet.* 38, 429–439 (2007)
- ROTHSCHILD, M., and SOLLER, M.: Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. *Probe* 8, 13–20 (1997)
- RÖHRS, M.: Geschichte der Tierzucht. In: KRÄUSSLICH, H. (Ed.): *Tierzüchtungslehre*. 4. Aufl. S. 37–55. Stuttgart: Eugen Ulmer 1994
- SCHREINER, R.: *Klonen durch Zellkerntransfer. Stand der Forschung*. Berlin: Selbstverlag Nationaler Ethikrat 2005
- The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium*: The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324, 522–528 (2009)
- The ENCODE Project Consortium*: Identification and analysis of functional elements in 1 % of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799–816 (2007)
- THEN, C.: *Dolly ist tot. Biotechnologie am Wendepunkt*. 1. Aufl. Zürich: Rotpunktverlag 2008
- THOMSEN, B., HORN, P., PANITZ, F., BENDIXEN, E., PETERSEN, A. H., HOLM, L.-E., NIELSEN, V. H., AGERHOLM, J. S., ARNBJERG, J., and BENDIXEN, C.: A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res.* 16, 97–105 (2006)
- THOMSON, A. J., and McWHIR, J.: Biomedical and agricultural applications of animal transgenesis. *Mol. Biotechnol.* 27, 231–244 (2004)
- VAN LAERE, A.-S., NGUYEN, M., BRAUNSCHEWIG, 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)
- VENTER, J. C., et al.: The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351 (2001)
- WADE, C. M., et al.: Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 326, 865–867 (2009)
- WALDMANN, K., und PLONAIT, H.: Hernia scrotalis und Hernia inguinalis (Inguinal hernai, „rupture“). In: PLONAIT, H., und BICKHARDT, K. (Eds.): *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. 2. Aufl. S. 315–320. Berlin: Parey 1997
- WEINSTOCK, G. M.: ENCODE: More genomic empowerment. *Genome Res.* 17, 667–668 (2007)
- WENSING, C. J.: Testicular descent in the rat and a comparison of this process in the rat with that in the pig. *Anat. Rec.* 214, 154–160 (1986)
- ZHANG, Z. D., PACCANERO, A., FU, Y., WEISMAN, S., WENG, Z., CHANG, J., SNYDER, M., and GERSTEIN, M. B.: Statistical analysis of the genomic distribution and correlation of regulatory elements in the ENCODE regions. *Genome Res.* 17, 787–797 (2007)

Prof. Dr. Christoph KNORR
Georg-August-Universität Göttingen
Department für Nutztierwissenschaften
Abteilung Reproduktion und Biotechnologie landwirtschaftlicher Nutztiere
Burckhardtweg 2
37077 Göttingen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 551 3913945
Fax.: +49 551 393381
E-Mail: cknorr@gwdg.de

Epigenetische Reprogrammierung bei präimplantativen bovinen Embryonen aus assistierten Reproduktionstechniken

Heiner NIEMANN ML (Neustadt)

Mit 2 Abbildungen und 1 Tabelle

Zusammenfassung

Epigenetik beinhaltet biochemische Veränderungen an der DNA und den Histonproteinen, die mit Veränderungen in der Genexpression verbunden sind, vererbbar sind, aber die DNA-Basenabfolge nicht verändern. Wesentliche Mechanismen sind die DNA-Methylierung und die biochemische Veränderung der Histonproteine durch Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen oder Carboxylierungen. Ferner werden zu den epigenetischen Mechanismen in der Embryonalentwicklung die X-Chromosom-Inaktivierung und die Ausbildung der physiologischen Telomerenlänge gezählt. Die DNA-Methylierung spielt eine wesentliche Rolle in der frühen Embryonalentwicklung beim Säuger, da die spezifischen Genexpressionsmuster durch entsprechende DNA-Methylierungsveränderungen, in Form einer De- und Remethylierung in der Präimplantationsphase sichergestellt werden. Inzwischen liegen ausreichend Daten vor, die zeigen, dass die assistierten Reproduktionstechniken (ARTs) mit einem erhöhten Risiko für epigenetische Veränderungen verbunden sind, die wiederum mit Aberrationen in der Entwicklung einhergehen können. Studien an präimplantativen Rinderembryonen können wesentliche neue Erkenntnisse, sowohl im Grundlagenbereich, mit Bedeutung für humanen ARTs, als auch für die Weiterentwicklung und Verbesserung biotechnologischer Verfahren in der Rinderzucht liefern.

Abstract

Epigenetics includes biochemical modifications of the DNA and the core histone proteins that are associated with changes in gene expression that can be passed on to progeny, but do not involve structural changes of the DNA sequence. The important mechanisms are DNA methylation and specific biochemical changes of the histone proteins by acetylation, methylation, phosphorylation and carboxylation. X-chromosome inactivation and telomere length regulation are further important epigenetic mechanisms that occur during early mammalian development. The DNA methylation profile plays a critical role in mammalian preimplantation development. The specific gene expression patterns are regulated by waves of de- and remethylation of the embryonic DNA. A growing number of studies shows that assisted reproductive technologies (ARTs) such as *in vitro* fertilization of oocytes and *in vitro* culture of embryos are associated with an increased risk of epigenetic changes that in turn may result in developmental deficiency and aberrations. Preimplantation bovine embryos have evolved as an important model for epigenetic studies on embryos and can provide valuable data for both improved ARTs in human infertility treatment and improved biotechnological procedures in cattle production.

1. Einleitung

Die genetische Information einer Zelle ist in der Basenabfolge ihrer DNA begründet, die in das Chromatin, mit den Histonproteinen als Hauptkomponente, verpackt ist. Unter Epigenetik werden im Wesentlichen biochemische Veränderungen an der DNA und den Histonproteinen verstanden, die mit Änderungen in der Genexpression verbunden sein können, vererbbar sind,

aber die Basensequenz in der DNA nicht verändern. Die primäre epigenetische Modifikation ist die DNA-Methylierung, die durch das Anheften einer Methylgruppe an die Cytosinbase im GC-Dinukleotid erfolgt. Dies ist ein alter evolutionärer Vorgang, der meist mit dem Silencing (Abschalten) eines Gens bei eukaryotischen Organismen verbunden ist (ANTEQUERA 2003). Im Säuger genom mit seinen 23–25 000 Genen sind die Regionen mit DNA-Methylierung nicht gleichmäßig verteilt, sondern liegen in 30–40 000 sogenannten CpG-Inseln vor, d. h. genomischen Bereichen mit einer Größe von 200–2000 Nukleotiden, in denen der G+C-Anteil mehr als 50 % beträgt und das Verhältnis von tatsächlich beobachteten zur erwarteten Anzahl von CpGs höher als 0,6 ist. Diese CpG-Inseln werden besonders in Promotorregionen von sogenannten *Housekeeping*-Genen gefunden, sind aber auch in gewebespezifischen Genen nachgewiesen worden (ANTEQUERA 2003). Ein korrektes Muster dieser Cytosinmethylierung an den CpG-Dinukleotiden ist essentiell für die normale Entwicklung beim Säuger (LI 2002). Aberrationen vom physiologischen DNA-Methylierungsmuster können mit einem Absterben der Embryonen oder Feten verbunden sein. Die DNA-Methylierung spielt darüber hinaus eine wesentliche Rolle bei der Unterdrückung parasitärer Promotoren, z. B. von Viren, und ist Teil des Gen-Silencing-Mechanismus in eukaryotischen Zellen (JONES 1999). In den allermeisten Fällen ist die DNA-Methylierung mit dem Abschalten der Genexpression verbunden; jedoch ist in den letzten Jahren eine steigende Anzahl an Genen gefunden worden, die durch Methylierung aktiviert werden kann, insbesondere Tumorsuppressor-Gene (JONES 1999, LI 2002). Die epigenetische Regulation wird als wesentlich für die Ausbildung der biologischen Komplexität multizellulärer Organismen angesehen, und die Komplexität der epigenetischen Regulation nimmt mit der Größe des Genoms zu (MAGER und BARTHOLOMEI 2005).

Epigenetische Mechanismen und Phänomene haben in den letzten Jahren stark an wissenschaftlichem und medizinischem Interesse gewonnen, besonders im Zusammenhang mit der Tumorentstehung und der Entwicklung der assistierten Reproduktionstechniken (ART), sowohl bei Nutztieren als auch beim Menschen. Im Folgenden wird zunächst ein kurzer Überblick über wesentliche epigenetische Mechanismen in der frühen Embryonalentwicklung beim Säuger gegeben. Im Anschluss daran wird auf die Bedeutung der Epigenetik für die Anwendung von ARTs zur Behandlung der menschlichen Infertilität und zur Steigerung der Effizienz in der modernen Tierzucht, mit Schwerpunkt bei der Embryonenproduktion *in vitro* und somatischem Klonen, eingegangen. Abschließend werden Beispiele aus jüngeren eigenen Forschungsarbeiten zu epigenetischen Analysen bei Rinderembryonen aus unterschiedlichen Produktionssystemen gegeben.

2. DNA-Methyltransferasen (DNMT)

Die DNA-Methylierung hängt im Wesentlichen von der Aktivität bestimmter Enzyme, den DNA-Methyltransferasen (DNMTs), ab. Die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT-1) ist ein Enzym, das die Methylierung der hemi-methylierten CpG-Dinukleotide nach der DNA-Replikation wieder herstellt; es ist also ein Unterhaltungsenzym (BESTOR 1992). Die oozytenspezifische Isoform DNMT-1 α ist verantwortlich für die Unterhaltung der maternalen Imprints in den weiblichen Gameten. DNMT-3a und -3b sind Enzyme, die die *De-novo*-Methylierung der DNA katalysieren und damit für das Setzen neuer DNA-Methylierungsstellen in der Entwicklung entscheidend sind (OKANO et al. 1999). DNMT-3L wird zusammen mit DNMT-3a und -3b gefunden und ist wahrscheinlich an der Etablierung spezifischer Methylierungsmuster

für das Imprinting in der weiblichen Keimleiste beteiligt (BOURC'HIS et al. 2001). Die Aktivität der DNA-Methyltransferasen ist eng mit der von Histon-Deacetylasen (HDAC), Histon-Methyltransferasen (HMTs) und mehreren ATPasen verbunden; alle Enzyme sind also Teil eines komplexen Systems, das die Chromatinstruktur reguliert und damit die Genexpression wesentlich beeinflusst (BURGERS et al. 2002).

3. Genom-Reprogrammierung durch DNA-Methylierung während der Embryonalentwicklung

Während der fruhlen Embryonalentwicklung beim Säuger wird die DNA kurz nach der Bildung der Zygote (frisch befruchtete Oozyte) durch massive Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster reprogrammiert. Die paternale DNA wird unmittelbar nach der Fertilisierung aktiv demethyliert, während die maternale DNA etwas später durch passive Mechanismen demethyliert wird (DEAN et al. 2003). Diese Mechanismen scheinen hoch konserviert zu sein und sind bei einer Reihe von Spezies gefunden worden, wie Maus, Rind, Schwein, Ratte, Kaninchen und Mensch (LEPIKHOV et al. 2008). Zu speziesspezifischen Zeitpunkten in der Entwicklung beginnt dann die Remethylierung der embryonalen DNA; der Beginn der Remethylierung fällt meist zusammen mit dem Start der embryonalen genomischen Aktivität (Maus: 2-Zellstadium, Schwein: 4-Zellstadium, Rind: 8–16-Zellstadium, Mensch: 8–16-Zellstadium). Diese komplexen Mechanismen stellen sicher, dass entscheidende Schritte in der fruhlen Embryonalentwicklung, wie der Beginn der ersten Zellteilung, die Kompaktierung der embryonalen Zellen bei der Morulabildung, die Blastozystenentwicklung mit der Ausbildung der beiden Zellkompartimente ICM (Innere Zellmasse) und Trophoblast, sowie Expansion und Schlüpfen der Blastozyste, durch eine fein regulierte Abfolge im Genexpressionsmuster ungestört ablaufen können.

4. Imprinting

Das Imprinting stellt eine besondere Funktion der DNA-Methylierung dar. Charakteristisch für das Imprinting ist, dass die zwei Allele eines bestimmten Gens unterschiedlich exprimiert werden. Üblicherweise wird durch das Imprinting entweder das maternale oder das paternale Allel während der Entwicklung durch Anfügen einer Methylgruppe an das Cytosin in CpG-Dinukleotiden abgeschaltet. Die Expression geschieht dann nur von dem einen nicht-methylierten Allel. Die DNA-Methylierung vollzieht sich insbesondere an den *Imprinting Control Regions* (ICRs) und wird im Wesentlichen durch die *De-novo*-Methyltransferase DNMT-3a sichergestellt. Typisch für die dem Imprinting unterliegenden Gene ist, dass sie in sogenannten Clustern gefunden werden und dass die ICRs eine regionale Kontrolle der Genexpression ausüben (REIK und WALTER 2001). Bei der Maus sind bisher etwa 50, beim Menschen etwa 80 Gene, die dem Imprinting unterliegen, identifiziert worden (DEAN et al. 2003, CONSTANCIA et al. 2004); beim Rind sind bisher ~10 *Imprinted*-Gene gefunden worden. Das Imprinting ist ein epigenetischer Mechanismus, der Anforderungen, Zuteilung und Nutzung der Ressourcen für den sich entwickelnden Fetus regelt und deshalb in der fetalen und neonatalen Entwicklung beim Säuger aktiv ist. In den meisten Fällen erhöhen Gene, die vom paternal vererbten Allel exprimiert werden, den Ressourcenverbrauch von der Mutter zum Fetus, während maternal

exprimierte Gene diesen Transfer reduzieren, um das Überleben der Mutter sicherzustellen (CONSTANCIA et al. 2004). Die Imprintmarkierungen werden während der Entwicklung der Keimzellen zu reifen Gameten (Spermien und Oozyten) gesetzt. In der Keimbahn werden die Imprintmarkierungen so angelegt, dass die reifen Gameten das Geschlecht der jeweiligen Keimbahn widerspiegeln, bedingt durch die Abfolge von Löschen und Wiedereinsetzen der jeweiligen DNA-Methylierungsmarkierungen (REIK und WALTER 2001).

5. Histonmodifikationen

Die Histone sind die Hauptproteinkomponenten des Chromatins; die vier Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 bilden das Nukleosom. Post-transnationale Modifikationen der Histone spielen bei der Fähigkeit des Genoms, biologische Informationen zu speichern, freizusetzen und weiter zu vererben, eine entscheidende Rolle (FISCHLE et al. 2003). Zahlreiche Histon- und Chromatin-assoziierte regulatorische Veränderungen sind bekannt, wie die Histon-Acetylierung, -Phosphorylierung, -Carboxylierung und -Methylierung. Histon-Methyltransferasen (HMTs) katalysieren die Methylierung an spezifischen Positionen des Nukleosoms in Säugerzellen. Die Deacetylierung der Histonproteine wird durch Isoformen der Histon-Deacetylase (HDAC) durchgeführt. Die Histon-Acetyltransferasen (HATs) sind an verschiedenen biologischen Prozessen, wie transkriptioneller Aktivierung, Genabschaltung, DNA-Reparatur und Zellzyklus, beteiligt und spielen deshalb in Wachstum und Entwicklung eine entscheidende Rolle (CAROZZA et al. 2003).

6. Epigenetik und assistierte Reproduktionstechniken

Mit der Etablierung des Embryotransfers in den 1980er Jahren konnte erstmalig das genetische Potential von züchterisch besonders wertvollen weiblichen Tieren in einer Population vermehrt werden. Dabei werden die Embryonen aus der Gebärmutter superovulierter Spendertiere ausgespült und dann entweder nach Tiefgefrieren oder direkt auf Empfängertiere übertragen. Neben dieser *In-vivo*-Produktion von Embryonen sind in den letzten zwei Jahrzehnten verschiedene *In-vitro*-Verfahren zur Erzeugung von Embryonen, insbesondere beim Rind, bis zur Praxisreife entwickelt worden (KUES et al. 2008b). Die *In-vitro*-Produktion von Embryonen beinhaltet die Gewinnung von Oozyten entweder aus Schlachthofmaterial oder von lebenden Tieren mit Hilfe der ultraschallgeleiteten Follikelpunktion (OROPEZA et al. 2007), die anschließende Reifung der Oozyten *in vitro* bis zu befruchtungsfähigen Metaphase-II (MII)-Oozytenstadien, die *In-vitro*-Fertilisation durch eine etwa 20-stündige Kokubation mit den vorbereiteten Spermien sowie die anschließende 6–8 Tage dauernde *In-vitro*-Kultur bis zu transfertauglichen Stadien, d. h. späten Morulae und Blastozysten (WRENZYCKI et al. 2001). Im Jahre 2008 sind weltweit etwa 540 000 *in vivo* produzierte Embryonen und 255 000 *in vitro* produzierte Embryonen übertragen worden (THIBIER 2009).

Neben der *In-vitro*-Produktion können entwicklungsfähige Embryonen auch durch somatisches Klonen erstellt werden. Dabei wird eine intakte somatische Zelle, zumeist Fibroblasten, in eine entkernte, *in vitro* gereifte Oozyte übertragen, beide Komponenten werden durch kurze elektrische Impulse miteinander fusioniert, die erstellten Komplexe werden chemisch und/oder elektrisch aktiviert und anschließend bis zu transfertauglichen Stadien *in vitro* kultiviert.

viert. Bei Rind und Schwein liegen bereits ausreichende Daten zur Produktion entwicklungs-fähiger geklonter Blastozysten vor (KUES et al. 2008b). Beim Rind können inzwischen durch Klonen mit gleicher Häufigkeit (30–35 % der befruchteten Oozyten) entwicklungsfähige Blastozysten erstellt werden wie durch *In-vitro*-Fertilisation und Kultur.

Trotz vielfältiger und intensiver Forschungsanstrengungen bestehen aber noch große Unterschiede zwischen *in vitro* produzierten, durch Klonen erstellten und *in vivo* erzeugten Rinderembryonen. Die Unterschiede betreffen die Morphologie (Farbe, Dichte, Zellzahl und Größe), den exakten Zeitpunkt der Zellteilungen in der Entwicklung, den Triglyceridgehalt, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber tiefen Temperaturen, verminderte Stabilität der Zona pel-lucida, Unterschiede im embryonalen Metabolismus sowie häufig eine erhöhte embryonale und fetale Mortalität (WRENZYCKI et al. 2005b). Nach Transfer *in vitro* kultivierter Embry-onen kann es zu einer Erhöhung des durchschnittlichen Geburtsgewichts bei den Kälbern kommen. In einer eigenen Studie (LAZZARI et al. 2002) betrug das Geburtsgewicht von Käl-bern, die aus Embryonen hervorgingen, die in Kulturmedium bis zu Blastozysten entwickelt worden waren, 53–57 kg, während bei den Kälbern aus Kontrollembryonen, die nach Super-ovulation bzw. künstlicher Besamung gewonnen wurden, durchschnittliche Geburtsgewichte von 43–45 kg festgestellt wurden (LAZZARI et al. 2002). Nach Übertragung von geklonten Embryonen sind teilweise noch stärkere Veränderungen beobachtet worden, insbesondere zu Beginn der Untersuchungen zum somatischen Klonen. Dabei wurden neben der Übergrö-ße verschiedene weitere pathologische Veränderungen festgestellt, die unter dem Überbe-griff *Large Offspring Syndrome* (LOS) zusammengefasst werden und besonders Klone von Rind, Schaf und Maus betrafen. Durch verbesserte Protokolle des Klonvorgangs und vertiefte Kenntnisse der epigenetischen Reprogrammierung ist das Auftreten von LOS in den letzten Jahren stark zurückgegangen. Die nach dem Klonen beobachteten Entwicklungsstörungen werden mit Fehlern in der epigenetischen Reprogrammierung in Verbindung gebracht (NIE-MANN et al. 2008). Beim somatischen Klonen kommt es zur größtmöglichen epigenetischen Reprogrammierung, indem das Expressionsprofil der differenzierten Zelle komplett gelöscht wird und das neue embryonalspezifische Expressionsprofil etabliert werden muss, um eine ungestörte embryonale und fetale Entwicklung sicherzustellen (NIEMANN et al. 2008). Dies beinhaltet die Abschaltung von ~8000–10000 gewebespezifischen Genen in der somatischen Zelle und den Beginn des embryonalspezifischen Programms der Genexpression mit mehr als 10000–12000 Genen (KUES et al. 2008a).

Die Embryonalentwicklung beim Rind wird vielfach als Modell für die humane Embry-onalentwicklung, insbesondere im Zusammenhang mit den zunehmend eingesetzten ARTs verwendet. Die ARTs (*In-vitro*-Fertilisation, Intracytoplasmatische Spermieninjektion, ICSI, etc.) werden angewendet, um Patienten mit Fertilitätsstörungen zu einem Kind zu verhelfen. Es wird geschätzt, dass bereits ~5–10 % der Kinder in den Industrieländern durch ARTs ge-boren werden. Ein mögliches erhöhtes Risiko von Defekten bei Kindern aus ARTs wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Jedoch liegen inzwischen gesicherte Beobachtungen vor, die für ein erhöhtes Risiko von Entwicklungsabnormalitäten bei Kindern aus ART sprechen. Nach ICSI wurde eine erhöhte Frequenz im Auftreten des Imprinting-Defekts Angelmann-Syndrom gegenüber entsprechenden Kontrollen beobachtet. Nach Anwendung von *In-vitro*-Fertilisation und ICSI war das Auftreten von Beckwith-Wiedemann-Syndrom, einem epige-netisch bedingten Defekt mit Ähnlichkeiten zum LOS, von durchschnittlich 1–2 auf 4–5 % verdoppelt. Ferner wurde ein erhöhtes Auftreten von Retinoblastoma festgestellt. Nach Über-tragung von IVF/ICSI-produzierten Embryonen traten darüber hinaus häufiger monozygote

Zwillinge auf, die wiederum ein vermindertes Geburtsgewicht aufwiesen. Eine umfassende Analyse der vorliegenden Daten hat ergeben, dass zwei Drittel der publizierten Studien ein um etwa 25 % erhöhtes Risiko für Geburtsfehler nach ART zeigen (HANSEN et al. 2005). In einer Metaanalyse wurde ein statistisch gesichertes erhöhtes Risiko von 30–40 % für epigenetische Defekte in Zusammenhang mit ART nachgewiesen (HANSEN et al. 2005). Bei Kindern aus ART mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom wurde der Verlust der Methylierung an einer ICR festgestellt (LIM et al. 2009). Zudem ist nachgewiesen worden, dass sich das Kulturmedium, in dem *in vitro* fertilisierte Embryonen für einige Tage kultiviert werden, auf das Geburtsgewicht der Neugeborenen auswirken kann (DUMOULIN et al. 2010). Diese Befunde sprechen eindeutig für epigenetische Effekte während der Entwicklung, bedingt durch die extrakorporale *In-vitro*-Phase.

Da grundlegende Studien an Humanembryonen auf Grund ethischer Erwägungen und gesetzlicher Begrenzungen nur in sehr geringem Umfang möglich sind, wird das RindermodeLL zunehmend zur Aufklärung epigenetischer Störungen herangezogen (WRENZYCKI et al. 2005a). Bovine Embryonen sind aus einer Reihe von Gründen besonders als Modell für das Studium der humanen Embryonalentwicklung geeignet. Rind und Mensch sind unipar, beide haben eine Tragezeit von 9 Monaten. Rinderembryonen weisen eine gleichlange Präimplantationsphase wie humane Embryonen auf, das bovine embryonale Genom wird zum gleichen Zeitpunkt wie im humanen Embryo aktiviert, die Verteilung der mikrotubulären Elemente ist ebenso wie die metabolische Aktivität und die Interaktionen mit dem Kulturmedium bei Rinderembryonen und humanen Embryonen sehr ähnlich. In all diesen Punkten unterscheidet sich das bisherige Modell, die Mausentwicklung, deutlich von der humanen Entwicklung. Beim Rinderembryo können zudem *in vivo* erzeugte Embryonen als „physiologischer Standard“ herangezogen werden, was beim Menschen aus den erwähnten ethischen Aspekten und aufgrund der gesetzlichen Rahmenbedingungen in den meisten Ländern nicht möglich ist. Ebenso können beim Rind Studien zur epigenetischen Reprogrammierung nach somatischem Kerntransfer durchgeführt werden, was im Humanbereich bisher nur in Ansätzen mit der Zielsetzung therapeutisches Klonen erfolgt ist. Von Vorteil ist ferner, dass das Rindergenom vor kurzem vollständig sequenziert und annotiert worden ist (*The Bovine Sequencing Consortium* 2009).

7. DNA-Methylierung in bovinen Embryonen unterschiedlicher Herkunft

Wir haben in einer kürzlich publizierten Studie Veränderungen in der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit der Anwendung assistierter Reproduktionstechniken, insbesondere nach somatischem Kerntransfer, bei Rinderembryonen untersucht (NIEMANN et al. 2010). Für diese Studie wurden 25 entwicklungsrelevante Gene, lokalisiert auf 15 verschiedenen Chromosomen, ausgewählt, die tieferen Einblick in die Regulation der frühen Embryonalentwicklung geben (Tab. 1). Insgesamt haben wir dazu eine Gruppe von 41 Amplikons, die 1079 CpG-Stellen beinhalten, mit Hilfe der Bisulfitssequenzierung auf Änderungen im DNA-Methylierungsmuster untersucht. Die Methylierungsanalyse wurde an DNA aus Pools von jeweils 80 Blastozysten durchgeführt, die entweder *in vivo* gewonnen, d. h. aus den Uterushörnern superovulierter Spenderkühe ausgespült, oder durch *In-vitro*-Produktion erstellt (*In-vitro*-Reifung, -Fertilisation, -Kultur) oder durch somatischen Kerntransfer mit weiblichen oder männlichen Fibroblasten erzeugt worden waren. Die einzelnen Gene waren dabei

durch eine unterschiedliche Anzahl (~10–40) an CpG-Stellen representiert. Die embryonalen DNA-Methylierungsmuster wurden mit denen der somatischen Komponenten, Blutzellen sowie männlichen und weiblichen Fibroblasten, aus denen die Embryonen geklont wurden, verglichen.

Tab. 1 Ausgewählte Gene für DNA-Methylierungsanalysen bei bovinen Embryonen

Funktion	Gene
Gap Junctions	Cx43 (Connexin 43)
DNA-Methylierung	DNMAP 1, DNMT 3a, 3b
Translation	EIF2-AK3, ARFGEF 2
Glucose-Transporter	Glut-3, -8
Wachstumsfaktoren	IGFII, IGFIIr
Differenzierung	LIF, LIFr, NNAT
Pluripotenz	Oct4, Nanog
Telomeren-Regulation	Telomerase, Reverse Transkriptase
Trophoblast-Funktion	Interferon tau 1, Mash 2
Imprinting	PEG-3, -10, -11
Maternale Expression	ZAR 1, MATER

Nach Kernttransfer wurde eine massive epigenetische Reprogrammierung gefunden, die als erheblich reduzierte Methylierung in den Embryonen erkennbar war (Abb. 1). Es wurde ferner festgestellt, dass nicht alle Gene und Amplikons gleich empfindlich auf den Klonvorgang reagierten. Bei einer Reihe von Amplikons blieb das Methylierungsmuster nach somatischem Kernttransfer unverändert. Durch eine weitergehende Analyse von 28 besonders informativen Amplikons (sogenannten *Hotspot Loci*), die 523 individuelle CpG-Stellen representieren, wurden Amplikons mit Methylierungsmustern identifiziert, die charakteristisch für eine bestimmte Kategorie von Embryonen waren. Diese könnten deshalb metastabile Epiallele representieren. Bei einer Gruppe von Amplikons wurde gefunden, dass der Hauptunterschied in der DNA-Methylierung zwischen den differenzierten somatischen Zellen und der embryonalen DNA bestand. Diese Gruppe umfasste Amplikons der Gene IGF2R, ARGEF2, GLU8, NANOG, OCT4 und PEG3 sowie Telomerase. Eine zweite Gruppe beinhaltete Amplikons mit gleichen DNA-Methylierungsmustern bei *in vitro* produzierten und geklonten Blastozysten, die aber unterschiedlich zu allen anderen Proben waren. Diese Gruppe beinhaltete Amplikons der Gene DNMT-3b, DMAP, NNAT, PEG11 und SUV39H1. Als drittes wurde eine Gruppe von Amplikons gefunden, die typisch für *in vitro* produzierte Embryonen waren (DMAP1, LIF, PEG11 und SUV39H1). Die letzte Gruppe an Methylierungsprofilen war spezifisch für geklonte Embryonen und beinhaltete Amplikons der Gene ARGEF, DNMT3B, GLU8, LIFR, NANOG, PEG11 und SUV39H1.

Eine Analyse der mRNA-Expression mit Hilfe quantitativer *Real-Time*-Polymerasekettenreaktion (PCR) für 8 ausgewählte Gene aus den gleichen Embryonen, deren DNA für die Methylierungsanalyse herangezogen worden war, ergab keine direkte Korrelation mit dem jeweiligen DNA-Methylierungsmuster, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen war, dass die untersuchten CpGs/Amplikons sich nicht in Regulationselementen befinden. Mit dieser Studie wurde erstmals die weitgehende Demethylierung der DNA differenzierter somatischer

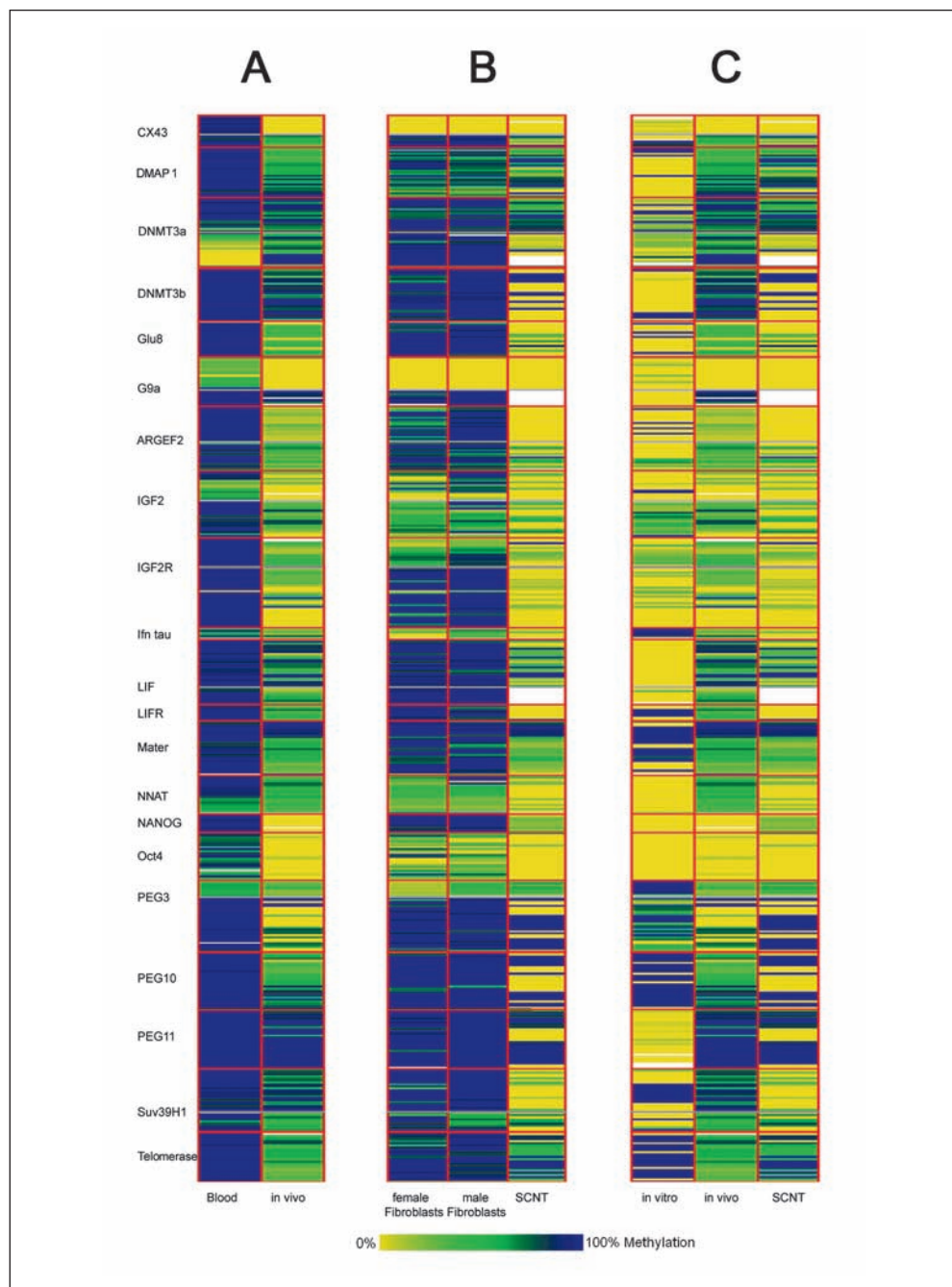


Abb. 1 Unterschiede in der Methylierung von 21 ausgewählten entwicklungsrelevanten Genen. Die DNA wurde aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs), weiblichen oder männlichen Fibroblasten, und bovinen Embryonen aus *In-vivo*- oder *In-vitro*-Produktion sowie bei geklonten Embryonen gewonnen. Die einzelnen Gene sind durch rote Linien voneinander getrennt, und jede Reihe zeigt den Methylierungsstatus für einzelne CpG-Gene, die durch 2

Zellen nach somatischem Klonen nachgewiesen. Darüber hinaus wurden durch die Ergebnisse dieser Studie erstmals spezifische CpGs/Amplikons identifiziert, die zur Beurteilung der Blastozystenqualitat herangezogen werden können und Aussagen zum Reprogrammierungszustand nach somatischem Klonen machen können. Sie können ferner zur Lokalisierung epigenetischer Kontrollregionen innerhalb von individuellen Genen und zum Studium von Zelldifferenzierung und Pluripotenz dienen (NIEMANN et al. 2010).

8. Reprogrammierung im DMR des IGF2-Gens in bovinen Blastozysten

Das IGF2-Gen (*Insulin-like growth factor 2*) kodiert für einen Wachstumsfaktor, der für eine reguläre embryonale und fetale Entwicklung von essentieller Bedeutung ist. Wir hatten in einer vorangegangenen Studie im letzten Exon des IGF2-Gens eine *Differentiated Methylated Region* (DMR) identifiziert (GEBERT et al. 2006). Diese DMR war im paternalen Allel methyliert, d. h., sie wurde vom maternalen Allel exprimiert. Mit Hilfe der Bisulfitsequenzierung haben wir eine Analyse des Methylierungsmusters in dieser DMR in bovinen Blastozysten aus verschiedenen Produktionssystemen vorgenommen (GEBERT et al. 2009). Diese Analyse ergab, dass die DMR in Zygoten zu 30 % methyliert war. Der Methylierungsgrad ging bis auf 5 % im 4-Zellstadium zurück und stieg dann bis zum Blastozystenstadium auf 10 % wieder an, wobei zwischen *in vivo* und *in vitro* produzierten Blastozysten keine Unterschiede bestanden. In dieser Studie wurde darüber hinaus das Geschlecht der Embryonen durch Y-Chromosom-spezifische PCR ermittelt. Bei *in vivo* produzierten Embryonen war die DNA-Methylierung in weiblichen Blastozysten signifikant niedriger als in männlichen Blastozysten; dieser Geschlechtsdimorphismus blieb auch in geklonten Embryonen erhalten (Abb. 2). Bei geklonten weiblichen Blastozysten war diese DMR zu 12 % methyliert, bei männlichen Embryonen zu 30 %. Im Gegensatz dazu war der Methylierungsgrad bei weiblichen und männlichen Spermazellen nicht unterschiedlich und lag bei 80 %. Weitere Kontrollen, wie parthenogenetische und androgenetische Blastozysten, zeigten einen niedrigen bzw. hohen Methylierungsgrad, entsprechend dem Vorliegen ausschließlich maternaler bzw. paternaler DNA.

Diese Ergebnisse zeigen, dass an dieser kritischen und sensitiven DMR die epigenetische Reprogrammierung in geschlechtsspezifischer Weise auch nach somatischem Klonen stattfand, was für einen intakten Reprogrammierungsmechanismus spricht. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass die Methylierungsmuster von der Herkunft der Embryonen abhängig sind und damit die Methylierung ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel zur Ermittlung der Embryonenqualitat vor dem Transfer sein kann (GEBERT et al. 2009).

Amplikons representiert sind, sie sind durch eine graue Linie getrennt. Der Methylierungsgrad der einzelnen CpGs ist farbig gekennzeichnet: Gelb (niedrige Methylierung), grün (mittlerer Methylierungsgrad), blau (hoher Methylierungsgrad), weiß (keine Methylierungsdaten). Die DNA in differenzierten somatischen Zellen ist stärker methyliert (blau), während die DNA in embryonalen Zellen deutlich geringer methyliert ist (gelb). Die Säulen unter A zeigen einen Vergleich zwischen PBMCs und *in vivo* gewonnenen Embryonen. Säule B zeigt einen Vergleich zwischen geklonten Blastozysten und den Fibroblasten, aus denen sie geklont wurden. Säule C zeigt einen Vergleich zwischen den drei Typen an Embryonen (*in vivo*, *in vitro*, somatisches Klonen).

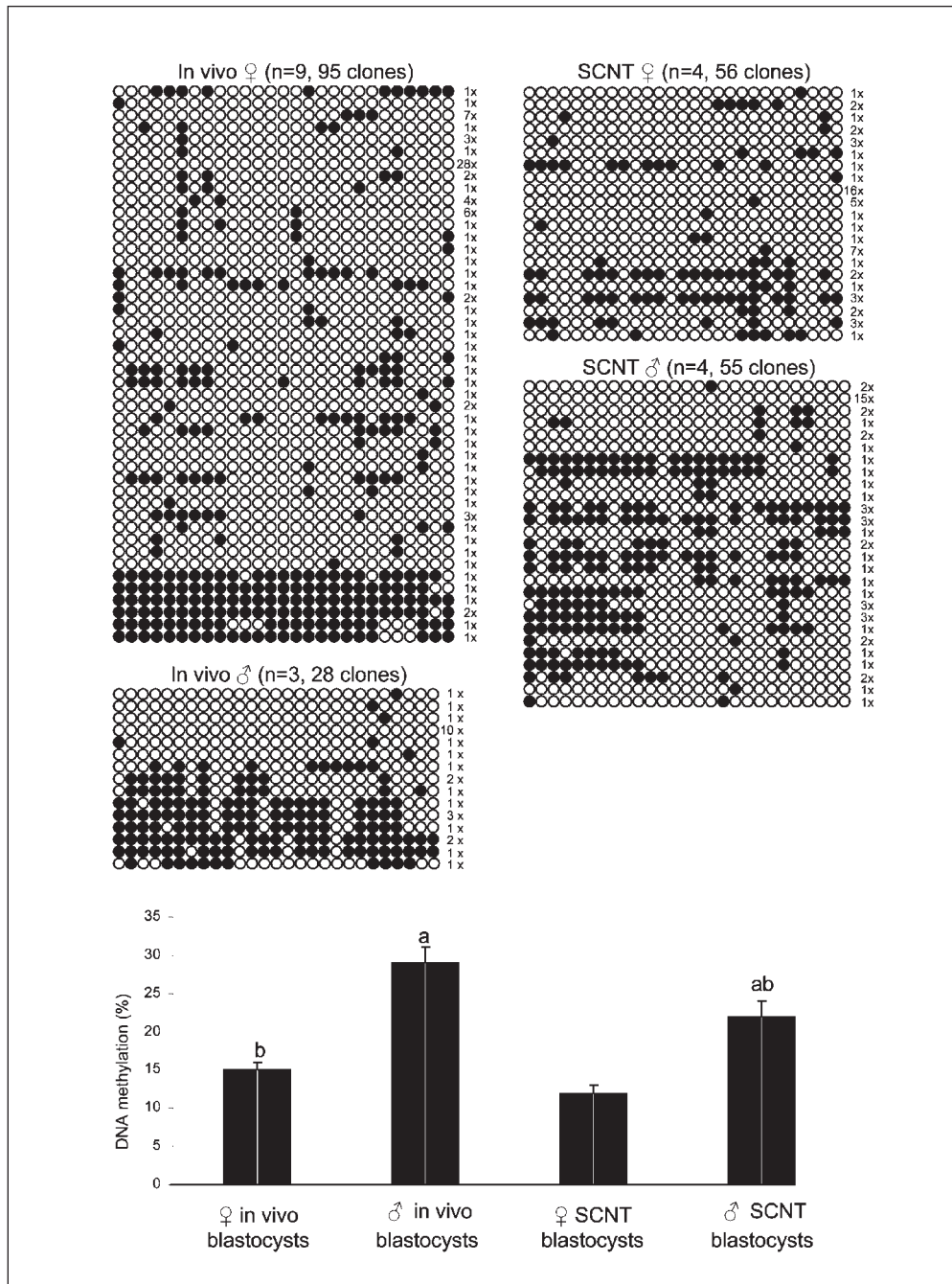


Abb. 2 Die im bovinen IGF2 gelegene DMR zeigt ein geschlechtsspezifisches Methylierungsmuster in männlichen und weiblichen Blastozysten. Bei *in vivo* gewonnenen Blastozysten ist die Methylierung in weiblichen deutlich geringer als in männlichen Blastozysten. Ein ähnliches Methylierungsmuster wird in geklonten Blastozysten beobachtet, was auf eine korrekte Reprogrammierung hinweist. Die primären Daten aus der Bisulfitssequenzierung sind

9. Schlussfolgerungen und zukünftige Entwicklung

Das Methylierungsmuster am Cytosin der DNA ist ein prioritärer Faktor in der epigenetischen Kontrolle eukaryotischer Organismen und hat bedeutende Implikationen für Gesundheit und Ausbildung von Entwicklungsstörungen und Krankheiten. Die Aufklärung der DNA-Methylierungsprofile im gesamten Genom ist wesentlich für das Verständnis der physiologischen Bedeutung der Epigenetik in der embryonalen, fetalen und postnatalen Phase. In den letzten Jahren hat es große methodische Fortschritte in der Analyse der DNA-Methylierung gegeben (BAKER 2010). Nachdem viele Jahre nur einzelne Gene, besonders mit Hilfe der Bisulfitsequenzierung, in Bezug auf die DNA-Methylierung untersucht werden konnten, stehen heute Verfahren zur genomweiten Analyse der DNA-Methylierung zur Verfügung; damit kann das gesamte Epigenom dargestellt werden (LAIRD 2010). Ferner haben verschiedene Grundlagenarbeiten nachgewiesen, dass neben den bekannten Regulationsmechanismen, wie den DNMT-Enzymen, weitere regulative Mechanismen von Seiten der small-RNAs (smRNAs), Proteinen mit Domänen, die an methylierte DNA binden können, sowie DNA-Glykolasen an der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Epigenoms beteiligt sind. In dieser Hinsicht bestehen große Ähnlichkeiten zwischen Sugerorganismen und Pflanzen (LAW und JACOBSEN 2010).

Studien zur embryonalen Entwicklung bei Modellorganismen, wie Maus und Rind, im Wesentlichen in Zusammenhang mit der Entwicklung der *In-vitro*-Produktion von Embryonen und dem somatischen Klonen sowie bei der Produktion von Humanembryonen in Zusammenhang mit den ARTs haben ergeben, dass diese frühe Entwicklungsphase besonders empfindlich auf Mängel in der Umwelt reagiert, was tiefgreifende epigenetische Veränderungen zur Folge hat. Viele der heutigen Protokolle für ARTs bei Mensch und Tier können daher mit massiven epigenetischen Aberrationen verbunden sein. Eine intensive interdisziplinäre Forschung zur Aufklärung epigenetischer Mechanismen ist deshalb erforderlich, um Entwicklungsabnormalitaten zu reduzieren oder vollständig zu vermeiden. Die Praimplantationsentwicklung beim Rind kann in diesen Forschungsarbeiten als Modell eine wichtige Rolle spielen.

als Kreise gezeigt; offene Kreise repräsentieren nicht-methylierte CpGs, schwarze Kreise repräsentieren methylierte CpGs. Horizontale Linien von Kreisen repräsentieren einen Klon, die Anzahl der Klone mit dem gleichen Methylierungsprofil ist am rechten Ende der Linien angegeben. Die gleichen Daten sind im Säulendiagramm nach statistischer Analyse (ANOVA, Bonferroni-Test) unten dargestellt.

Literatur

- ANTEQUERA, F.: Structure function and evolution of CpG island promoters. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1647–1658 (2003)
- BAKER, M.: Epigenome: mapping in motion. *Nature Meth.* **7**, 181–185 (2010)
- BESTOR, T. H.: Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J.* **11**, 2611–2617 (1992)
- BOURC'HIS, D., XU, G.-L., LIN, C.-S., BOLLMAN, B., and BESTOR, T. H.: Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**, 2536–2539 (2001)
- BURGERS, W. A., FUKS, F., and KOUZARIDES, T.: DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet.* **18**, 275–277 (2002)
- CAROZZA, M. J., UTLEY, R. T., WORKMAN, J. L., and COTE, J.: The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**, 321–329 (2003)
- CONSTANCIA, M., KELSEY, G., and REIK, W.: Resourceful imprinting. *Nature* **432**, 53–57 (2004)
- DEAN, W., SANTOS, F., and REIK, W.: Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **14**, 93–100 (2003)
- DUMOULIN, J. C., LAND, J. A., VAN MONTFOORT, A. P., NELISSEN, E. C., 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)
- FISCHLE, W., WANG, Y., and ALLIS, C. D.: Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* **425**, 475–479 (2003)
- GEBERT, C., WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., GROEGER, D., REINHARDT, R., HAJKOVA, P., LUCAS-HAHN, A., CARNWATH, J., LEHRACH, H., and NIEMANN, H.: The bovine *IGF2* gene is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. *Genomics* **88**, 222–229 (2006)
- GEBERT, C., WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., GRÖGER, D., THIEL, J., REINHARDT, R., LEHRACH, H., HAJKOVA, P., LUCAS-HAHN, A., CARNWATH, J. W., and NIEMANN, H.: DNA methylation in the *IGF2* intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. *Genomics* **94**, 63–69 (2009)
- HANSEN, M., BOWER, C., MILNE, E., KLERK, N. DE, and KURINCZUK, J. J.: Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects – a systematic review. *Hum. Reprod.* **20**, 328–338 (2005)
- JONES, P. A.: The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* **15**, 34–37 (1999)
- KUES, W., 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 (2008a)
- KUES, W. A., RATH, D., and NIEMANN, H.: Reproductive biotechnology in farm animals goes genomics. *CAB Rev.* **3**, 1–18 (2008b)
- LAIRD, P. W.: Principles and challenges of genome wide DNA methylation analysis. *Nature Rev. Genet.* **11**, 191–203 (2010)
- LAW, J. A., and JACOBSEN, St. E.: Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Rev. Genet.* **11**, 204–220 (2010)
- LAZZARI, G., WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., DUCHI, R., KRUIP, T., NIEMANN, H., and GALLI, C.: Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.* **67**, 767–775 (2002)
- LEPIKOV, 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* **1/1**, 8 (2008)
- LI, E.: Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Rev. Genet.* **3**, 662–673 (2002)
- LIM, D., BOWDIN, S. C., TEE, L., KIRBY, G. A., BLAIR, E., FRYER, F., LAM, W., OLEY, C., COLE, T., BRUETON, L. A., REIK, W., MACDONALD, F., and MAHER, E. R.: Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum. Reprod.* **24**, 741–747 (2009)
- MAGER, J., and BARTHOLOMEI, M. S.: Strategies for dissecting epigenetic mechanisms in the mouse. *Nature Genet.* **37**, 1194–1199 (2005)
- NIEMANN, H., TIAN, X. C., KING, W. A., and LEE, R. S. F.: Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction* **135**, 151–163 (2008)
- NIEMANN, H., CARNWATH, J. W., HERRMANN, D., WIECZOREK, G., LEMME, E., LUCAS-HAHN, A., and OLEK, S.: DNA methylation patterns reflect epigenetic reprogramming in bovine embryos. *Cell. Repogr.* **12**, 33–42 (2010)

- OKANO, M., BELL, D. W., HABER, D. A., and LI, E.: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257 (1999)
- OROPEZA, A., HADELER, K. G., and NIEMANN, H.: Application of ultrasound-guided follicular aspiration (OPU) in prepubertal and adult cattle. *J. Reprod. Dev.* 52, 31–38 (2007)
- REIK, W., and WALTER, J.: Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Rev. Genet.* 2, 21–32 (2001)
- The Bovine Sequencing Consortium*, ELSIK, C. G., TELLAM, R. L., and WORLEY, K. C.: The genome sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution. *Science* 324, 522–528 (2009)
- THIBIER, M.: Data Retrieval Committee statistics of Embryo Transfer – Year 2008. The worldwide statistics of embryo transfer in farm animals. *IETS Newsletter* 27, 13–19 (2009)
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., KESKINTEPE, L., MARTINS, A., SIRISATHIEN, S., BRACKETT, B., and NIEMANN, H.: Effects of basic culture medium and protein supplementation on mRNA expression in preimplantation bovine embryos. *Hum. Reprod.* 16, 893–901 (2001)
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., GEBERT, C., KORSawe, K., LEMME, E., CARNWATH, J. W., and NIEMANN, H.: Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 75, 1–9 (2005a)
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., KORSawe, 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 (2005b)

Prof. Dr. Heiner NIEMANN
Institut für Nutztiergenetik
Friedrich-Loeffler-Institut
Bundesinstitut für Tiergesundheit
Mariensee
Holtystrae 10
31535 Neustadt
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 5034 871135
Fax: +49 5034 871143
E-Mail: heiner.niemann@fli.bund.de

Individuelle und globale Ernährungssituation – gibt es (noch) eine Lösung?

Gemeinsames Symposium
der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina
und der Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW)
vom 30. bis 31. Oktober 2008 in Wien

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 108, Nr. 374
Herausgegeben von Gottfried BREM (Wien)
(2010, 152 Seiten, 41 Abbildungen, 21 Tabellen, 22,50 Euro,
ISBN: 978-3-8047-2800-4)

Der Anteil der Menschen, die übergewichtig bis fettleibig sind, ist heute ebenso groß wie der Anteil derjenigen, die an Hunger leiden – jeweils fast eine Milliarde! Die Beiträge hinterfragen, welche Handlungsalternativen wir im Hinblick auf unsere individuelle und globale Ernährungssituation haben. Sie zeigen auf, was wir tun können, um den globalen Hunger zu bekämpfen, und was wir tun müssen, um die individuelle Ernährungssituation in den Griff zu bekommen.

Zurzeit sehen wir mit der Umnutzung von Ackerböden für den *Non-Food*-Bereich Entwicklungen, die die globale Nahrungsmittelverfügbarkeit weiter verschärfen. Dazu werden Fragen der Nahrungsmittelproduktion und -verteilung – bis hin zum Einsatz von Gentechnik – behandelt, um eine ausreichende Versorgung der Weltbevölkerung zu erreichen. Der Band diskutiert Ursachen und Folgen von Über- und Mangelernährung und hebt besonders die gesundheitspolitische Relevanz der Ernährungsfrage hervor.

III. Anwendungen der Gen- und Genomanalytik

Erbfehler bei Nutztieren

Cord DRÖGEMÜLLER (Bern, Schweiz)

Mit 3 Abbildungen und 1 Tabelle

Zusammenfassung

Die Struktur moderner Nutztierpopulationen offenbart immer wieder Ausbrüche vererbter Krankheiten, sogenannter Erbfehler. Wenn bedeutende Zuchttiere als unbekannte Träger einer rezessiv vererbten Mutation mit hoher Frequenz eingesetzt werden, kann es wenige Generationen später zu einem massiven Auftreten eines Erbfehlers kommen. Nach einem Ausbruch hat es in der Vergangenheit mehrere Jahre gebraucht, bis traditionelle Selektionsstrategien das Auftreten eines Erbfehlers begrenzt haben. Seit 20 Jahren werden DNA-Tests zur raschen und nachhaltigen Selektion gegen Erbfehler entwickelt. Allerdings ist deren Verfügbarkeit bei Rind, Schwein, Schaf und Ziege nach wie vor sehr beschränkt. Die Methoden der molekularen Analyse von Erbfehlern haben sich in dieser Zeit parallel zum jeweiligen Stand der Genomanalyse entwickelt. Somit haben sich der Aufwand und die Zeitdauer vom Erkennen eines Erbfehlerproblems bis zur Entwicklung eines Gentests insbesondere in den letzten zwei Jahren erheblich reduziert. Mehrere Beispiele zeigen, dass rund 10 erkrankte Tiere genügen, um die Kartierung der Mutation im Genom zu erreichen. Somit kann heute in wenigen Wochen ein indirekter Markertest für die Tierzucht etabliert werden. Das Aufspüren kausaler Mutationen stellt jedoch nach wie vor eine Herausforderung dar. Die gezielte Anreicherung bestimmter Genomabschnitte in Kombination mit hochparallelen Genotypisierungsmethoden zeigt sich als sehr geeignet, wie das aktuelle Beispiel zur erfolgreichen Analyse der vererbten Spinnengliedrigkeit beim Schweizer Braunvieh-Rind zeigt.

Abstract

Outbreaks of inherited diseases or genetic defects occur over and over again in modern livestock populations. If unknown carriers of mutations inherited as recessives were used as important breeding animals, this may lead to a significant occurrence of a specific genetic defect some generations later. In the past, it took years to eradicate a recessive disease by traditional selection programs. Over the past 20 years, some DNA tests have become available as efficient and sustainable selection tools. However, the availability of gene tests for cattle, pig, sheep and goat breeders is still limited. Methods used for the molecular analysis of genetic defects have been dramatically changed by the availability of genome wide analysis. Therefore, the effort and time period from the recognition of a specific genetic defect until the release of gene test has been significantly shortened, particularly during the last two years. Several examples have now shown that about 10 affected individuals are sufficient to find the position of a mutation on the genome map. Thus, today the establishment of an indirect marker based test for animal breeders can be achieved within weeks. However, the identification of the causative mutation still remains a challenge. A targeted enrichment of specific genome segments, in combination with next generation sequencing technologies arises as very suitable. The recent elucidation of the mutation causing inherited arachnomelia in Brown Swiss cattle is an example of the successful application of this approach.

1. Bedeutung von Erbfehlern bei Nutztieren

Bei landwirtschaftlichen Nutztieren sind angeborene Missbildungen und Krankheiten, die sich zum Teil erst später im Leben manifestieren, in der Regel mit wirtschaftlichen Verlusten

für den Tierhalter und Schmerzen und Leiden der betroffenen Tiere verbunden. Die möglichen Ursachen sind vielfältig und umfassen neben genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren. Kongenitale Anomalien und Krankheiten, die nur in bestimmten Rassen bzw. familiär gehäuft auftreten, werden als Erbfehler oder genetische Defekte bezeichnet. Erbfehler sind in der Regel nicht therapierbar und stellen somit ein Problem der Tiergesundheit dar. Die Bekämpfung von Erbfehlern ist daher eine primäre Aufgabe der Tierzuchtwissenschaft. Tiere mit Erbfehlern sind häufig nicht lebensfähig oder zeigen eine deutlich verminderte Leistungsfähigkeit. Erbfehler beeinträchtigen daher einerseits die Produktivität des Viehzuchtbetriebes und andererseits den möglichen Zuchtfortschritt innerhalb einer Herde bzw. einer Population. Außerdem ist ein möglicher Imageschaden mit entsprechenden Konsequenzen auf den Zuchtviehmarkt bei Auftreten eines Erbfehlers innerhalb einer Rasse, bzw. innerhalb bestimmter Linien einer Rasse, nicht zu vernachlässigen. Schließlich widerspricht eine Missachtung von Erbfehlern Tierschutzaspekten.

Erbfehler entstehen entweder durch natürlich vorkommende, spontane oder umweltbedingt induzierte Mutationen während der Keimzellbildung. Die Auswirkung einer Mutation auf die Nachkommen hängt bei monogen vererbten Merkmalen von deren Zusammenspiel mit dem zweiten Allel am selben Genort bzw. bei Merkmalen, die von mehreren Genen beeinflusst werden, von den Allelen an anderen Genorten ab. Durch weitere, häufig ungeklärte genetische bzw. nichtgenetische Faktoren kann die Ausprägung eines Erbfehlers variieren. Diese sogenannte variable Expressivität ist z. B. bei der vererbten Einhufigkeit (Syndaktylie) der Holstein-Rinder beschrieben. Hierbei zeigen Kälber, die homozygot für eine rezessiv vererbte Mutationen im *LRP4*-Gen sind, eine unterschiedliche Anzahl missgebildeter Gliedmaßen (DRÖGEMÜLLER et al. 2007). Des Weiteren können Erbfehler eine unvollständige Penetranz aufweisen, z. B. sodass Tiere, die von ihrem Genotyp her erkennbar an einem Erbfehler leiden müssten, diesen nicht aufweisen.

Nach dem Auftreten eines Erbfehlers liefert die Analyse des Geschlechts und der Verwandtschaftsbeziehungen der betroffenen Tiere Hinweise auf das mögliche Vererbungsmuster eines Erbfehlers. Hierzu sind exakte Aufzeichnungen über das Auftreten von Missbildungen notwendig, und die Missbildung sollte diagnostisch bestätigt und exakt abgegrenzt sein. Mit Hilfe von Segregationsanalysen kann abgeschätzt werden, ob einzelne oder mehrere Gene für die Ausprägung eines Erbfehlers verantwortlich zu machen sind. Die meisten bekannten Erbfehler bei Nutztieren folgen einem einfachen monogen autosomal rezessiven Erbgang nach MENDEL (Abb. 1). Nachdem eine Mutation aufgetreten ist, kann es mehrere Generationen dauern, bis zufällig Elterntiere, die diese Mutation heterozygot tragen, miteinander verpaart werden. Das heißt, ein rezessiv vererbter Erbfehler tritt nur dann auf, wenn ein Nachkomme die Mutation sowohl von seinem Vater als auch von seiner Mutter vererbt bekommt und somit homozygot für die Mutation ist. Tiere, die nur ein Allel der Mutation neben einer weiteren unveränderten Kopie besitzen, sind äußerlich völlig normal und werden als Anlageträger bezeichnet. Diese Anlageträger lassen sich nicht von erbgesunden Tieren unterscheiden und werden erst mit dem Auftreten von betroffenen Nachkommen als solche erkannt. Solange die Mutation unerkannt ist, geben sie das unerwünschte Allel in der Population weiter und können somit zu einer Steigerung der Frequenz der Erbfehlermutation beitragen. Mitunter besteht zusätzlich ein Selektionsvorteil von Trägern bei Kopplung zu Mutationen mit Einfluss auf erwünschte Merkmale oder beim Vorliegen pleiotroper Effekte der Erbfehlermutation. Ein Beispiel hierfür ist die Zucht auf Fleischreichtum beim Schwein, die parallel zu einem gehäuftem Auftretens des malignen Hyperthermie-Syndroms (Stressanfälligkeit) geführt hat.

Dieser Erbfehler wird durch eine rezessiv vererbte Mutation im *RYRI*-Gen verursacht (FUJII et al. 1991), und die Selektion gegen diese Mutation ist auch nach fast 20 Jahren noch nicht abgeschlossen.

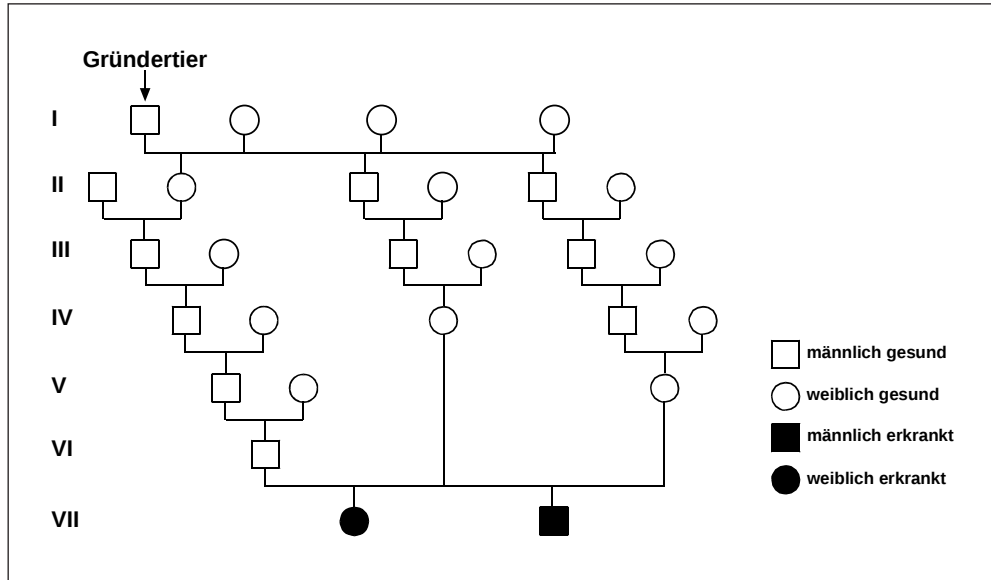


Abb. 1 Stammbaum einer Familie mit einem monogen autosomal rezessiv vererbten Erbfehler. Inzuchtverpaarungen haben zum Auftreten von Merkmalsträgern nach mehreren Generationen geführt. Die erkrankten Tiere haben einen gemeinsamen Vater und die Mütter sind über einen gemeinsamen Vorfahren jeweils mit dem Vater verwandt. Dieser gemeinsame Ahne (Gründertier) stellt den wahrscheinlichen Ursprung für die mehrere Generationen rezessiv vererbte Mutation dar.

Die Tierzucht hat in den letzten 100 Jahren beeindruckende Fortschritte erzielt. So stieg z. B. die durchschnittliche jährliche Milchleistung von Kühen in diesem Zeitraum von weniger als 2000 kg auf heute mehr als 9000 kg. Nur durch diesen Zuchtfortschritt kann die weltweit steigende Nachfrage nach qualitativ hochwertigen tierischen Nahrungsmitteln gedeckt werden. Der Erfolg der Rinderzucht beruht auf der konsequenten Selektion der jeweils leistungsstärksten Tiere für die Zucht innerhalb einer Rasse. Dabei kann insbesondere auf der väterlichen Seite sehr streng selektiert werden, da wenige Stiere genügen, um mit Hilfe der künstlichen Besamung sehr viele Nachkommen zu erzeugen. Auf der mütterlichen Seite ist die Selektion weniger streng, da immer eine genügend hohe Anzahl an Kühen benötigt wird, um die Kälber auszutragen. In der modernen Milchviehzucht wird heute international fast ausschließlich die künstliche Besamung eingesetzt, und es ist nicht ungewöhnlich, wenn ein besonders leistungsstarker Besamungsstier mehrere 10000 direkte lebende Nachkommen in der ganzen Welt hat. Die Beschränkung auf wenige Besamungsstiere führt zwangsläufig zu einem Verlust an genetischer Vielfalt sowie einer Zunahme der Inzucht. Damit können sich unerwünschte Erbfehlermutationen im Genom extrem schnell in einer Population ausbreiten. In einer Population, in der die Allelfrequenz für einen Erbfehler gering ist, kann ein Stier sehr viele gesunde Nachkommen zeugen, bevor er als Anlagenträger enttarnt wird. Damit

verbreitet er zunächst den Erbfehler in der Population. Letztlich steigt damit das Risiko einer zufälligen Verpaarung von Anlageträgern, die nach einigen Generationen zu einem gehäuftem Auftreten eines Erbfehlers führen kann. Jüngste Beispiele für Ausbrüche von Erbfehlern beim Rind sind die Spinnengliedrigkeit beim Deutschen Fleckvieh (BUIJKAMP et al. 2008) und die vererbte Neuropathie (Demetz-Syndrom) beim Tiroler Grauvieh (SÖLKNER et al. 2009).

2. Strategien zur Selektion gegen Erbfehler

Nach einem Ausbruch hat es in der Vergangenheit mehrere Jahre gebraucht, bis Zuchtauschlussstrategien sowie aufwändige Nachkommenprüfungen das Auftreten eines Erbfehlers begrenzt haben. Lange Zeit war die Durchführung von Testanpaarungen die einzige Möglichkeit zur Erkennung von Anlagenträgern. Die Möglichkeit ist in der Regel auf männliche Tiere beschränkt, z. B. werden Stiere als Testkandidaten an Kühe angepaart, die schon einmal ein von der Erbkrankheit betroffenes Kalb geboren haben (KÖNIG et al. 1987). Je mehr gesunde Nachkommen fallen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Stier anlagefrei ist. Eine hinreichend sichere Prüfung eines Testkandidaten erfordert zahlreiche Testanpaarungen, je nach Frequenz der Erbfehlermutation. Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass, falls der Testkandidat wirklich Anlagenträger ist, auf rund die Hälfte der Nachkommen die unerkannte Mutation weitergegeben wird. Somit kann diese Maßnahme zur Erkennung von Erbfehlern gleichzeitig zu deren Ausbreitung führen.

Seit dem Beginn der Genomanalyse bei Nutztieren vor rund 20 Jahren besteht für eine Reihe von Erbfehlern die Möglichkeit, DNA-basierte Testverfahren für die Selektion einzusetzen. Der wesentliche Vorteil ist eine frühzeitig im Leben der Tiere mögliche Erkennung von Anlageträgern. Je nach Stand der molekularen Analyse eines Erbfehlers kommen indirekte Markertests oder Gentests, die die ursächliche Mutation direkt nachweisen, zum Einsatz. Bei der indirekten Gendiagnose erfolgt eine Berechnung der Genotypenwahrscheinlichkeiten anhand von Abstammungsinformationen und Informationen gekoppelter Marker. Dabei ist das für den Erbfehler verantwortliche Gen nicht bekannt, aber einem bestimmten Chromosomenabschnitt zugeordnet. Im Gegensatz zum direkten Gentest sind hierbei nicht nur Proben des Individuums, sondern auch solche möglichst eng verwandter Tiere mehrerer Generationen nötig, um die Kopplungsphase, die die Erbfehlermutation mit den Markerallelen einnimmt, innerhalb der jeweiligen Familie herleiten zu können. Neben der Lokalisation des unbekannten Gens und der zur Berechnung verwendeten Marker müssen die Marker möglichst polymorph und im Idealfall flankierend positioniert sein. Häufig werden hierzu Mikrosatelliten-Marker eingesetzt, die hochvariable, repetitive DNA-Sequenzmotive darstellen und deren Genotypisierung im Labor einen relativ hohen Aufwand erfordert. Der Einsatz eines indirekten Markertests ist nach der Kartierung einer Erbfehlermutation im Genom möglich. In Abbildung 2 ist das Prinzip eines indirekten Markertests am Beispiel der vererbten Spinnengliedrigkeit (Arachnomelie) beim Schweizer Braunvieh dargestellt. Bei diesem Erbfehler wurde nach der Kartierung der Arachnomelie auf dem Rinderchromosom 5 und vor der Identifikation der kausalen Mutation (siehe unten) ein Markertest für die Selektion innerhalb von Familien etabliert (DRÖGEMÜLLER et al. 2009). Sobald das Gen und die verantwortliche Mutation für einen Erbfehler identifiziert sind, kann der Nachweis dieser Variation als direkter Gentests zur Selektion eingesetzt werden. Nunmehr kann jedes Tier direkt genotypisiert werden, es sind keine Proben weiterer Tiere notwendig. Der aktuelle Wissenstand über ge-

netische Merkmale und Erbfehler bei Nutztieren sowie der jeweilige Stand der molekularen Analyse sind in der Online-Datenbank OMIA „Online Mendelian Inheritance in Animals“ ersichtlich (<http://omia.angis.org.au/>). Hier werden zurzeit z. B. für das Rind insgesamt 380 Merkmale angegeben, 81 davon als monogene Merkmale. Von 51 dieser Merkmale wurde bereits die ursächliche Mutation auf DNA-Ebene identifiziert (Tab. 1).

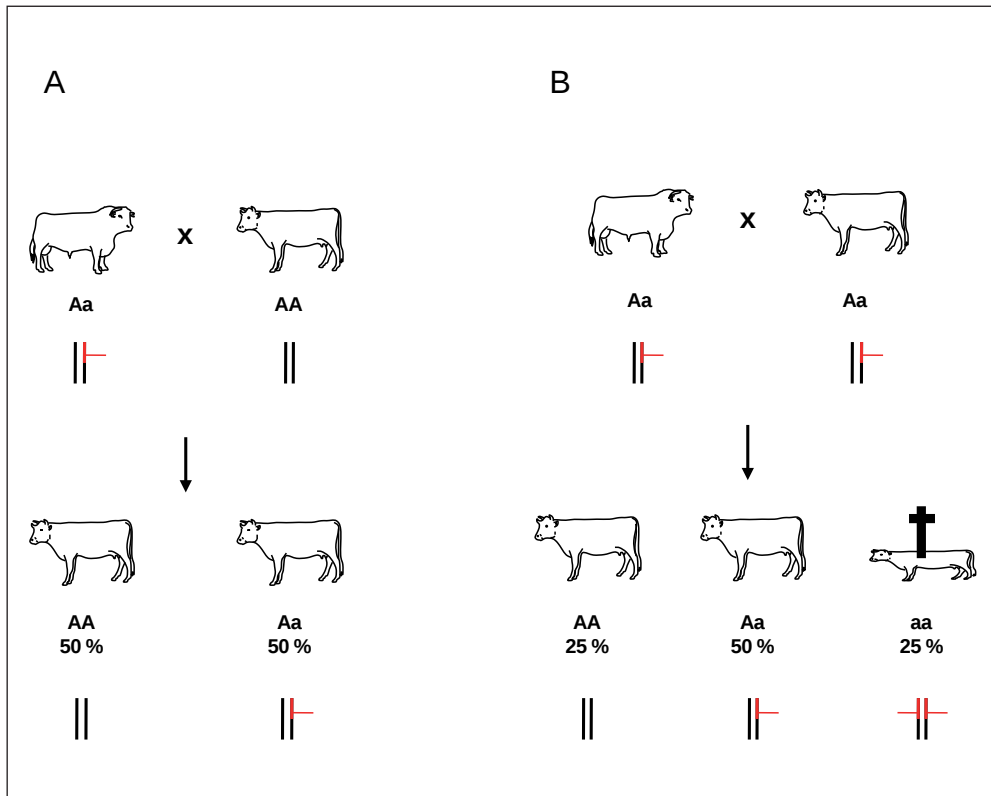


Abb. 2 Vererbung einer rezessiven Erbkrankheit und Prinzip des indirekten Gentests am Beispiel der Spinnengliedrigkeit (Arachnomelie, A) beim Schweizer Braunvieh. Die normale Kopie (Allel) des ursächlichen Gens wird mit A bezeichnet, die durch die schädliche Mutation veränderte Kopie wird mit a bezeichnet. Der sogenannte Genotyp beschreibt die genetische Ausstattung eines Tieres, hierfür werden die beiden Allele angegeben. Tiere mit dem Genotyp AA sind erbgesund, also frei von der Mutation, Tiere mit dem Genotyp Aa sind Anlageträger, aber selbst äußerlich gesund, und Tiere mit dem Genotyp aa sind sogenannte Merkmalsträger, welche im Falle der Arachnomelie beim Schweizer Braunvieh tot zur Welt kommen.

(A) Bei der Anpaarung eines Anlageträgers mit einer erbgesunden Kuh entstehen bei den Nachkommen 50 % Anlageträger und 50 % erbgesunde Tiere. Alle diese Tiere sind äußerlich völlig gesund und können aufgrund ihres eigenen Erscheinungsbildes nicht unterschieden werden.

(B) Bei der Anpaarung von zwei Anlageträgern werden 25 % erbgesunde Tiere, 50 % Anlageträger und 25 % togeborene Kälber geboren. Unterhalb der Tiere sind schematisch das väterliche und mütterliche Rinderchromosom 5 als vertikale Striche dargestellt. Die Mutation für die Arachnomelie ist durch einen horizontalen roten Strich dargestellt. Beim indirekten Gentest wird nicht die Mutation selbst, sondern der rot markierte benachbarte Chromosomenabschnitt nachgewiesen. Wenn ein Anlageträger das „schwarze“ Chromosom ohne die Mutation an seinen Nachkommen weitergibt, dann ist der Nachkomme frei von der Mutation und kann ohne weiteres für die Zucht eingesetzt werden.

Tab. 1 Genetische Merkmale und Erbfehler bei Nutztieren (Quelle: *Online Mendelian Inheritance in Animals* [OMIA], <http://omia.angis.org.au/>, Stand 10 April 2010).

Spezies	Anzahl genetischer Merkmale und Erbfehler	Anzahl monogener Merkmale	Anzahl molekular aufgeklärter Merkmale
Rind	380	182	51
Schaf	191	71	20
Ziege	71	10	7
Schwein	222	36	11
Huhn	179	72	24

Sobald eine DNA-Diagnostik für einen bestimmten Erbfehler möglich ist, kann ein gezieltes Selektionsprogramm entwickelt werden. Die Reduzierung der Frequenz einer Erbfehlermutation und somit der Erfolg eines solchen Programms hängt jedoch insbesondere davon ab, in welchem Umfang die DNA-Diagnostik eingesetzt wird (THOMPSON et al. 2006). Den leichtesten und zuverlässigsten Weg stellt die konsequente Genotypisierung aller Zuchttiere dar, was jedoch aus finanziellen Gründen in der Regel nicht durchführbar ist. In der Praxis beschränkt sich die Selektion gegen Erbfehler daher im Wesentlichen auf die männlichen Zuchttiere. Eine Analyse zur Entwicklung der Allelfrequenzen bei Holstein-Rindern nach mehreren Jahren der Gentest-basierten Selektion gegen zwei monogen rezessiv vererbte Erbkrankheiten (Bovine Leukozyten-Adhäsions-Defizienz [BLAD] und *Complex Vertebral Malformation* [CVM]) zeigt, dass die Frequenzen jeweils innerhalb von 5 Jahren von rund 10 % auf unter 1 % gesunken sind (SCHÜTZ et al. 2008). Allerdings zeigt diese Studie ebenfalls, dass eine theoretisch mögliche Eliminierung einer Erbfehlermutation innerhalb einer Population auch bei Vorhandensein eines direkten Gentests nicht vollständig gelingt. Einerseits werden nicht alle Zuchttiere getestet, und andererseits werden diagnostizierte Anlageträger nicht generell von der Zucht ausgeschlossen. Ein Gentest bietet nämlich auch die Möglichkeit, züchterisch besonders wertvolle Anlageträger kontrolliert einzusetzen, indem eine konsequente Selektion gegen die Träger der Erbfehlermutation erst unter den direkten Nachkommen erfolgt. Somit dienen Gentests auch der gezielten Erhaltung genetischer Vielfalt innerhalb von Populationen.

3. Strategien zur molekularen Analyse von Erbfehlern

Die erste Voraussetzung für die molekulare Analyse eines Erbfehlers bei Nutztieren ist die Erfassung im Feld. Die sorgfältige Diagnostik (Phänotypisierung) ist Grundlage für die Abschätzung der Häufigkeit des Auftretens und entscheidend für die Beurteilung der Frage, ob es sich um ein vererbtes und somit genetisches Problem handelt oder nicht. Für eine molekulargenetische Analyse muss DNA-haltiges Material (z. B. Blut, Gewebe, Haarwurzeln, Sperma) betroffener Tiere bzw. Familien gesammelt werden. Nach diesen Vorarbeiten erfolgen die weiteren Schritte im Labor (Abb. 3). Unterschiedliche Strategien bieten sich in Abhängigkeit von Erbgang, Krankheitsbild und verfügbarer Stichprobe an.

Zur Entwicklung eines gendiagnostischen Tests werden prinzipiell zwei Ansätze verfolgt. Wenn man die Entstehung des Erbfehlers bzw. die Biologie des Merkmals gut charakterisiert hat, kann man Vermutungen darüber anstellen, welches Gen betroffen sein könnte und

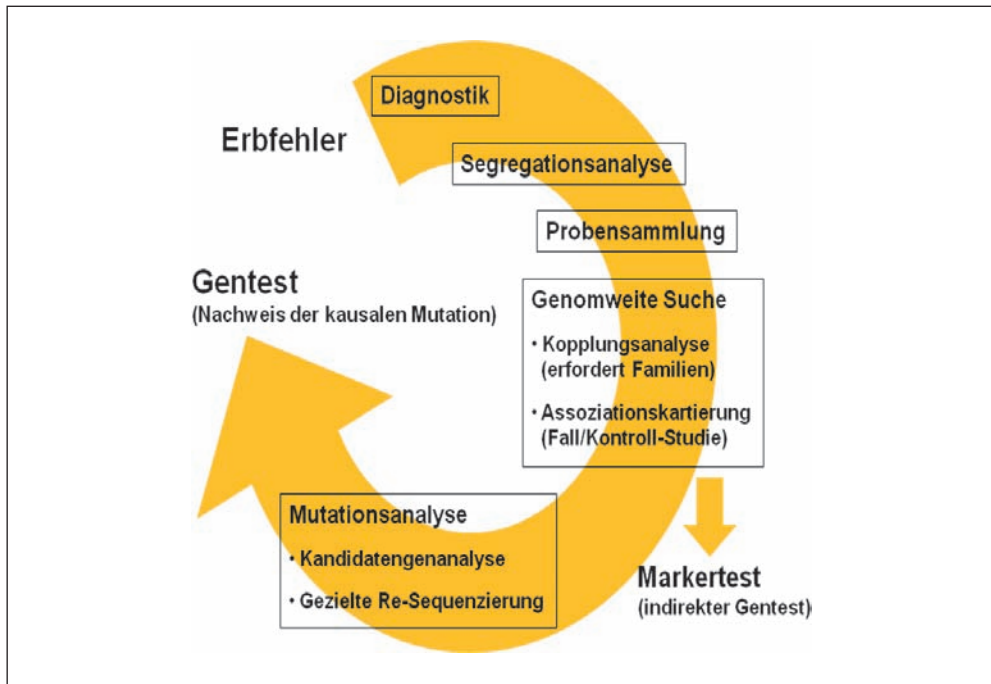


Abb. 3 Etappen der Gentestentwicklung

direkt so bei diesem Gen nach Veränderungen suchen. In manchen Fällen ergibt auch die vergleichende Betrachtung ähnlicher Phänotypen bei genetisch besser charakterisierten Spezies (z. B. Mensch oder Maus) Hinweise auf potentiell verantwortliche Gene. Dieser sogenannte Kandidatengenansatz wurde 1992 beim Rind zum ersten Mal erfolgreich zur Identifikation der für die monogen rezessiv vererbte Immunschwäche BLAD verantwortlichen *ITGB2*-Mutation eingesetzt (SHUSTER et al. 1992). Bis heute konnte dieser vergleichsweise effiziente Ansatz wiederholt für die molekulare Aufklärung von Erbfehlern bei Nutztieren erfolgreich verwandt werden (DRÖGEMÜLLER et al. 2001). Mit der Entschlüsselung des Genoms hat sich die gezielte Analyse ausgewählter Gene mittlerweile stark erleichtert, da die bis vor kurzem zwingend notwendigen und teilweise sehr aufwändigen Vorarbeiten zur Klonierung, Sequenzierung und Charakterisierung der einzelnen Kandidatengene entfallen. Ein aktuelles Beispiel zur erfolgreichen Anwendung des Kandidatengenansatzes stellt die Aufklärung der monogen rezessiv vererbten Pseudomyotonie beim italienischen Chianina-Rind dar. Für diese belastungsinduzierte Muskelkontraktion mit starker Ähnlichkeit zur vererbten Brody-Erkrankung des Menschen und experimentellen Hinweisen auf einen Defekt der bei der menschlichen Erkrankung defizienten sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Pumpe (SERCA1) konnte eine kausale Punktmutation im bovinen *ATP2A1*-Gen, welches für SERCA1 kodiert, nachgewiesen werden (DRÖGEMÜLLER et al. 2008).

Für den weitaus häufigeren Fall, dass es keinerlei Hinweise auf das betroffene Gen gibt, wird der Weg der sogenannten positionellen Klonierung gewählt. Hierbei wird das unbekannte Gen nach Zuordnung der betroffenen Genomregion identifiziert. Bei dieser genomweiten

Suche nach Chromosomenabschnitten mit Genen, die Erbfehler verursachende Mutationen tragen, wurden in den 1990er Jahren Kopplungsanalysen mit den damals verfügbaren gleichmäßig über das Genom verteilten, hochvariablen Mikrosatelliten-Markern durchgeführt. Hierzu werden DNA-Proben von Familien benötigt, in denen der Erbfehler auftritt. Es wird überprüft, ob bestimmte Markerallele in aufeinanderfolgenden Generationen gemeinsam mit dem Erbfehler vererbt werden. Ist ein Marker mit dem Erbfehler gekoppelt, so erben die betroffenen Nachkommen fast immer ein bestimmtes Markerallel. Je näher der Marker auf dem Chromosom in der Nähe des verantwortlichen Gens liegt, desto besser lässt sich ein solcher Marker für eine indirekte Gendiagnose einsetzen. Da innerhalb von Familien die Anzahl der beobachteten Rekombinationen klein ist, genügt hierfür eine relativ niedrige Markerdichte, um die Weitergabe von merkmalsassoziierten Chromosomenabschnitten innerhalb der Familien verfolgen zu können. Nach der Zuordnung einer bestimmten Chromosomenregion durch die Kopplungsanalyse werden die dort befindlichen Gene als sogenannte positionelle Kandidatengene betrachtet und untersucht, um die für den Erbfehler verantwortliche Mutation zu identifizieren. Das erste Erfolgsbeispiel für die molekulare Aufklärung eines Erbfehlers bei Nutztieren auf diese Weise stellt die Analyse des malignen Hyperthermie-Syndroms beim Schwein dar (FUJII et al. 1991). Dagegen ist z. B. für das monogen rezessiv vererbte Weaver-Syndrom beim Braunvieh das betroffene Gen bis heute unbekannt, obwohl es bereits 1993 als eines der ersten Erbfehler beim Rind durch Kopplungsanalyse im Genom kartiert worden ist (GEORGES et al. 1993).

Aktuell werden zur positionellen Klonierung vermehrt genomweite Assoziationskartierungen eingesetzt. Hierbei benötigt man Kohorten von Merkmalsträgern und Kontrolltieren. Dieser Ansatz beruht auf der Annahme, dass alle erfassten Fälle eines Erbfehlers durch eine identische Mutation gemeinsamen Ursprungs verursacht sind. Im Laufe der Generationen hat sich das Chromosom mit der Erbfehlermutation durch zahlreiche Rekombinationen verändert. Daher wird bei den untersuchten Merkmalsträgern davon ausgegangen, dass sie nur in unmittelbarer Nähe der kausalen Mutation, also dort wo auch in vielen Generationen keine Rekombination stattgefunden hat, noch die Allelkombinationen (Haplotypen) des Gründertiers aufweisen. Bei einem monogen autosomal rezessiven Merkmal ist davon auszugehen, dass in der unmittelbaren Umgebung der kausalen Mutation alle Fälle abstammungsidentisch und somit homozygot für die Allele des ursprünglichen Chromosoms mit der Gründermutation sind. Beim Vergleich der Allel- bzw. Genotypfrequenzen an vielen genetischen Markern, die über das ganze Genom verteilt sind, erwartet man für ein monogen vererbtes Merkmal, dass es nur eine Region im Genom gibt, bei der sich die Allel- bzw. Genotypfrequenzen signifikant zwischen Fällen und Kontrollen unterscheiden. In dieser Region liegt dann mit hoher Wahrscheinlichkeit die kausale Mutation. Bei der genomweiten Assoziationskartierung werden im Gegensatz zur familienbasierten Kopplungsanalyse viel mehr Rekombinationsereignisse analysiert. Daher werden für eine genomweite Assoziationskartierung wesentlich mehr Marker, in der Regel SNP-Marker (*single nucleotide polymorphisms*), typisiert. Dieser Weg ermöglicht eine verfeinerte Kartierung im Gegensatz zu einer Kopplungsstudie und grenzt somit die Anzahl positioneller Kandidatengene weiter ein.

Beim Rind wurden genomweite Assoziationskartierungen mit der Entschlüsselung des Rindergenoms ermöglicht (*Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium* 2009). Die parallel durchgeführte Entwicklung von sogenannten SNP-Mikroarrays, mit denen an einer DNA-Probe gleichzeitig 50 000 SNP genotypisiert werden können, ist im Vergleich zur Darstellung von Mikrosatelliten-Markern günstig und sehr effizient (CHARLIER et al. 2008). Im

Jahr 2008 sind die ersten erfolgreichen genomweiten Assoziationskartierungen für monogen autosomal rezessive Merkmale beim Rind publiziert worden (CHARLIER et al. 2008). Für 3 der bearbeiteten 5 Erbfehler wurden anschließend die ursächlichen Mutationen entdeckt und jeweils ein direkter Gentest entwickelt. Für die beiden übrigen Erbfehler können zumindest die assoziierten SNP-Marker für eine indirekte Gendiagnose genutzt werden. Bemerkenswert ist der im Vergleich zu früheren Kopplungsstudien geringe Aufwand, z. B. genügten für die Kartierung der Mutation für die Fischschuppenkrankheit beim italienischen Chianina-Rind die DNA-Proben von 3 Fällen und 9 Kontrollen (CHARLIER et al. 2008). Für die Kartierung der Mutation für die vererbte Neuropathie (Demetz-Syndrom) beim Tiroler Grauvieh genügten 14 Fälle, 15 Anlageträger und 8 Kontrollen (SÖLKNER et al. 2009). Damit konnte innerhalb weniger Wochen nach Beginn der Laboranalyse mit der markergestützten Selektion gegen diesen Erbfehler begonnen werden.

Mit der Verfügbarkeit eines SNP-Mikroarrays für das Schaf konnte im Jahr 2009 erstmals eine genomweite Assoziationskartierung für einen Erbfehler beim Schaf durchgeführt werden. Mit der Identifikation der für die monogen rezessiv vererbte Kleinäugigkeit (Mikrophthalmie) beim Texelschaf kausalen *PITX3*-Mutation steht ein weiterer Gentest zur Bekämpfung eines Erbfehlers beim Schaf zur Verfügung (BECKER et al. 2010).

Der Schritt zur Aufklärung kausaler Mutationen ist auch mit vereinfachter Kartierungstechnik mitunter problematisch. Insbesondere wenn die Pathogenese des Erbfehlers ungeklärt ist oder die kartierte Genomregion umfangreich bzw. reich an Genen ist, erfordert die Analyse positioneller Kandidatengene viel Aufwand. Die bisherigen PCR-basierten Ansätze zur vergleichenden Sequenzierung von erkrankten und gesunden Tieren haben Grenzen, insbesondere wenn die Mutationen außerhalb der proteinkodierenden Abschnitte lokalisiert oder falls strukturelle DNA-Variationen z. B. in Bereichen repetitiver DNA verantwortlich sind. Die gezielte Mikroarray-basierte Anreicherung von umfangreichen, bis zu mehreren Millionen Basenpaaren umfassenden genomischen Sequenzabschnitten und der anschließende Einsatz hochparalleler Genotypisierungsmethoden bietet eine aktuelle Möglichkeit zur effizienten und umfassenden Re-Sequenzierung zuvor eingegrenzter Erbfehler-assoziierter Chromosomenregionen. Die monogen rezessiv vererbte Spinnengliedrigkeit (Arachnomelie) beim Schweizer Braunvieh-Rind konnte durch Kopplungsanalyse auf einem rund 7 Millionen Basenpaare umfassenden Abschnitt auf dem Rinderchromosom 5 kartiert werden (DRÖGEMÜLLER et al. 2009). Mangels vielversprechender funktioneller Kandidatengene und der Vielzahl der annotierten Gene in diesem Segment wurde gezielt die gesamte zuvor kartierte Region mittels Mikroarray bei zwei Tieren angereichert und anschließend sequenziert. Die vergleichende Analyse der identifizierten Sequenzpolymorphismen zwischen dem Kalb mit Arachnomelie und einem gesunden Kontrolltier hat letztlich zur Identifikation einer 1bp-Insertion im kodierenden Abschnitt des *SUOX*-Gens geführt, die perfekt mit dem Auftreten der Arachnomelie assoziiert ist (DRÖGEMÜLLER et al. 2010). Der Fakt, dass das sequenzierte gesunde Kontrolltier ein ingezüchteter Anlageträger ist, und die Tatsache, dass dieses Tier in den rund 1000 proteinkodierenden Exons des gesamten Intervalls nur an einer einzigen Stelle im *SUOX*-Gen heterozygot war, lieferten einen perfekten genetischen Beweis für die Kausalität dieser Mutation. Die identifizierte Insertionsmutation verschiebt den *SUOX*-Leserahmen, was einen vorzeitigen Abbruch der Translation zur Folge hat. Somit ist dieser Erbfehler durch eine Funktionsverlustmutation eines Gens verursacht, welches zuvor nicht im Zusammenhang mit der Knochenentwicklung bekannt war.

4. Schlussfolgerungen

Praktisch kein Individuum ist frei von unerwünschten Mutationen. Daher treten neben den in der Literatur bei Nutztieren beschrieben genetischen Defekten immer wieder neue Erbfehler zu Tage. Die intensive Selektion in den heutigen Zuchtpopulationen hat bei allen Rassen zu Inzuchtpaarungen und zum vermehrten Auftreten von Erbfehlern geführt. Für die Wahl der Bekämpfungsstrategie steht heute, neben traditionellen Selektionsstrategien, eine stetig zunehmende Zahl an DNA-basierten Testverfahren zur Verfügung.

In Kombination mit der vollzogenen bzw. laufenden Entschlüsselung der Genome von nahezu allen relevanten Nutztierarten erlauben die derzeitigen Methoden der Molekulargenetik eine sehr rasche Entwicklung von Gentests. Somit kann frühzeitig nach dem Auftreten eines Erbfehlers eine zunächst markerbasierte, indirekte Selektion zur effizienten Bekämpfung des Erbfehlers durchgeführt werden. Das Aufspüren kausaler Mutationen stellt dagegen weiterhin eine Herausforderung dar. Die Möglichkeit einer gezielten Anreicherung zuvor kartierter Genomabschnitte in Kombination mit dem Einsatz hochparalleler Genotypisierungsmethoden bietet einen effizienten Ansatz zur Identifikation verantwortlicher Gene. Damit wird sich die molekulare Analyse von Erbfehlern zugunsten der Tiere verändern.

Literatur

- BECKER, D., TETENS, J., BRUNNER, A., BÜRSTEL, D., GANTER, M., KIJAS, J., and DRÖGEMÜLLER, C.: Microphthalmia in Texel sheep is associated with a missense mutation in the paired-like homeodomain 3 (*PITX3*) gene. *PLoS ONE* 5, e8689 (2010)
- Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, ELSIK, C. G., TELLAM, R. L., WORLEY, K. C., GIBBS, R. A., et al.: The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324, 522–528 (2009)
- BUITKAMP, J., LUNTZ, B., EMMERLING, R., REICHENBACH, H. D., WEPPERT, M., SCHADE, B., MEIER, N., and GÖTZ, K. U.: Syndrome of arachnomelia in Simmental cattle. *BMC Vet. Res.* 4, 39 (2008)
- CHARLIER, C., COPPIETERS, W., ROLLIN, F., DESMECHT, D., AGERHOLM, J. S., CAMBISANO, N., CARTA, E., DARDANO, S., DIVE, M., FASQUELLE, C., FRENNET, J. C., HANSET, R., HUBIN, X., JORGENSEN, C., KARIM, L., KENT, M., HARVEY, K., PEARCE, B. R., SIMON, P., TAMA, N., NIE, H., VANDEPUTTE, S., LIEN, S., LONGERI, M., FREDHOLM, M., HARVEY, R. J., and GEORGES, M.: Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nature Genet.* 40, 449–454 (2008)
- 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., DRÖGEMÜLLER, M., LEEB, T., MASCARELLO, F., TESTONI, S., ROSSI, M., GENTILE, A., DAMIANI, E., and SACCHETTO, R.: Identification of a missense mutation in the bovine *ATP2A1* gene in congenital pseudomyotonia of Chianina cattle: An animal model of human Brody disease. *Genomics* 92, 474–477 (2008)
- DRÖGEMÜLLER, C., LEEB, T., HARLIZIUS, B., TAMMEN, I., DISTL, O., HÖLTERSINKEN, M., GENTILE, A., DUCHESNE, A., and EGGEN, A.: Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (*LRP4*). *BMC Genet.* 8, 5 (2007)
- DRÖGEMÜLLER, C., ROSSI, M., GENTILE, A., TESTONI, S., JÖRG, H., STRANZINGER, G., DRÖGEMÜLLER, M., GLOWATZKI-MULLIS, M. L., and LEEB, T.: Arachnomelia in Brown Swiss cattle maps to chromosome 5. *Mamm. Genome* 20, 53–59 (2009)
- DRÖGEMÜLLER, C., TETENS, J., SIGURDSSON, S., GENTILE, A., TESTONI, S., LINDBLAD-TOH, K., and LEEB, T.: Identification of the bovine arachnomelia mutation by massively parallel sequencing implicates sulfite oxidase (SUOX) in bone development. *PLoS Genet.* 6, e1001079 (2010)
- FUJII, J., OTSU, K., ZORZATO, F., DELEON, S., KHANNA, V. K., WEILER, J. E., OBRIEN, P. J., and MACLENNAN, D. H.: Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253, 448–451 (1991)

- GEORGES, M., DIETZ, A. B., MISHRA, A., NIELSEN, D., SARGEANT, L. S., SORENSEN, A., STEELE, M. R., ZHAO, X. Y., LEIPOLD, H. W., WOMACK, J. E., and LATHROP, M.: Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1058–1062 (1993)
- KÖNIG, H., GAILLARD, C., CHAVAZ, J., HUNZIKER, F., und TONTIS, A.: Prüfung von Schweizer Braunvieh-Bullen auf das vererbte Syndrom der Arachnomelie und Arthrogrypose (SAA) durch Untersuchung der Nachkommen im Fetalstadium. *Tierärztl. Umsch.* 42, 692–697 (1987)
- SCHÜTZ, E., SCHARFENSTEIN, M., and BRENIG, B.: Implication of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency DNA-based testing on disease frequency in the Holstein population. *J. Dairy Sci.* 91, 4854–4859 (2008)
- SHUSTER, D. E., KEHRLI, M. E., ACKERMANN, M. R., and GILBERT, R. O.: Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9225–9229 (1992)
- SÖLKNER, J., GREDLER, B., DRÖGEMÜLLER, C., and LEEB, T.: Homozygosity mapping of a Weaver like recessive disorder in Tyrol grey cattle. Book of abstracts of the 60th Annual Meeting of the European Association for Animal Production No. 15, 182 (2009)
- THOMPSON, P. N., HEESTERBEEK, J. A. P., and VAN ARENDONK J. A. M.: Changes in disease gene frequency over time with differential genotypic fitness and various control strategies *J. Anim. Sci.* 84, 2629–2635 (2006)

Prof. Dr. Cord DRÖGEMÜLLER
Institut für Genetik
Vetsuisse-Fakultät
Universität Bern
Bremgartenstrasse 109a
3001 Bern
Schweiz
Tel.: +41 31 6312529
Fax: +41 31 6312640
E-Mail: Cord.Droegemueller@vetsuisse.unibe.ch

Chronobiologie

Leopoldina-Symposium am 19. März 2010 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 114, Nr. 389

Herausgegeben von Elmar PESCHKE (Halle/Saale)

(2011, 264 Seiten, 71 Abbildungen, 2 Tabellen, 24,95 Euro, ISBN: 978-3-8047-2942-1)

Ein „Zeitsinn“ oder ein Organ der „Zeitmessung“ im engeren Sinne sind bei Lebewesen nicht bekannt, dennoch ermöglichen die Sinnesorgane die Kontaktaufnahme nicht nur mit dem Raum, sondern auch mit Zeit-vermittelnden Ereignissen. Mit der Etablierung der Chronobiologie als einer medizinisch-biologischen Teildisziplin in der Mitte des 20. Jahrhunderts wurden in den zurückliegenden fünf Jahrzehnten jahrtausendealte Beobachtungen und Kenntnisse einer wissenschaftlichen Analyse zugeführt. Theoretische Grundlagen sowie klinische Implikationen der Chronobiologie stehen im Mittelpunkt des Bandes. Die Erkenntnisse über biologische Rhythmen haben sich in zunehmendem Maße als praxisrelevant erwiesen. Funktionelle Schäden durch häufig wechselnde Schichtarbeit, Leistungsabfall durch Jetlag, mangelnde Effizienz durch im Tagesverlauf nicht zeitgerechte Applikation von Zytostatika und zahlreiche weitere Beispiele erweisen die Chronobiologie als unverzichtbaren Bestandteil medizinischer Wissenschaft. Im vorliegenden Band werden so aktuelle Themen behandelt wie Morphologie und Mechanismen der Inneren Uhr, die Generierung circadianer Rhythmen und die biologische Funktion saisonaler und circannualer Rhythmen bei Mensch und Tier sowie Fragen, die für die Erforschung und Behandlung von Diabeteserkrankungen (z. B. die Bedeutung von Uhrengenen für die Insulinsekretion bzw. der Einfluss von Melatonin auf Sekretionsrhythmik und Signaltransduktionsprozesse der pankreatischen β -Zelle) oder für die Analyse von molekularem Stress (Mechanismen der protektiven Wirkung von Melatonin gegenüber oxidativem Stress) neue Einsichten liefern. Klinischen Aspekten der Chronobiologie widmen sich Beiträge zu Erkenntnissen aus der Genetik der Rhythmusgene für Wachen und Schlaf sowie zur Diagnostik und Therapie chronobiologischer Störungen im Alltag der Schlafmedizin.

Erbfehler bei Begleittieren

Tosso LEEB ML (Bern, Schweiz)

Mit 2 Abbildungen

Zusammenfassung

Die Entschlüsselung des Hundegenoms hat die molekulargenetische Aufklärung von Erbfehlern enorm beschleunigt, und in den letzten Jahren wurden weit über hundert Gentests für diverse monogen vererbte Merkmale bei Hunden publiziert. Auch in anderen Begleittierspezies wie z. B. Katzen wurden mehrere wichtige Erbfehler molekular aufgeklärt und eine genetische Diagnostik entwickelt. Die Geschwindigkeit dieser Forschungsarbeiten hängt jedoch ganz entscheidend davon ab, welche Ressourcen für die jeweiligen Spezies zur Verfügung stehen. Die Verfügbarkeit von möglichst vollständigen und fehlerfreien Genomsequenzen sowie Genotypisierungstechnologien, mit denen kostengünstig mehrere zehntausend bis mehrere hunderttausend polymorphe Stellen im Genom untersucht werden können, hat die typische Dauer der Kartierung einer Mutation von mehreren Jahren auf wenige Monate verkürzt. Für die Aufklärung der kausalen Mutationen selbst gibt es dagegen noch kein Patentrezept. Während Mutationen im kodierenden Bereich bekannter Gene im Allgemeinen relativ schnell aufgespürt werden, ist es nach wie vor äußerst schwierig, diejenigen ursächliche Mutationen zu identifizieren, die in nicht-charakterisierten Genen oder in nicht-kodierenden Bereichen liegen.

Die rasante wissenschaftliche und technologische Entwicklung bei der genetischen Diagnostik stellt die potentiellen Nutzer, also Tierbesitzer und praktische Tierärzte, vor große Herausforderungen. Einerseits kommen fast wöchentlich neue Tests auf den Markt, andererseits liegt für die meisten dieser Tests keine umfassende Validierung mit Angaben zu Sensitivität und Spezifität vor. Trotz dieser Einschränkung kann festgehalten werden, dass die neuen Möglichkeiten der genetischen Diagnostik eine deutliche Reduktion der Häufigkeit von Erbfehlern bei Begleittieren bewirken.

Abstract

Deciphering the canine genome has greatly accelerated the investigation of hereditary defects in dogs. In the last years, more than one hundred gene tests for diverse hereditary traits in dogs have been published. In other companion animal species such as e.g. the cat, the first few mutations underlying important Mendelian diseases were reported and genetic testing has been established. The rate of progress in this research field depends largely on the availability of some key resources for a given species. A complete and accurate genome sequence together with high-throughput genotyping assays that allow the analysis of tens of thousands to hundreds of thousands of markers has accelerated the mapping of a mutation from several years down to a few months. The identification of the causative mutations themselves is still challenging. Although mutations affecting the coding sequence of known genes are often quickly found, it remains difficult to identify mutations in previously uncharacterized genes or non-coding regions.

The rapid scientific and technological developments in genetic testing create new challenges for the potential users, e.g. animal owners and veterinarians. On the one hand new tests are being announced almost every week. On the other hand, for most of these tests no comprehensive validation including data on sensitivity and specificity is available. In spite of the limitations the new diagnostic options of genetic testing have caused a marked reduction in the frequency of genetic defects in companion animals.

1. Genetische Forschung an Hunden

Der Hund weist die größte phänotypische Vielfalt von allen Säugetierarten auf. So wiegt z. B. ein erwachsener Bernhardiner über 80 kg, während ein Chihuahua nur etwa 2–3 kg auf die Waage bringt. Ebenso weisen viele Hunderassen genetisch fixierte besondere Verhaltensweisen auf. Als Beispiel sei hier das unterschiedliche Temperament eines Border Collies im Vergleich zu einem Golden Retriever genannt. Diese beiden Rassen verfügen über fundamental verschiedene Charaktereigenschaften, die von den Züchtern durch sorgfältige Selektion über viele Generationen erzielt wurden. Diese enorme phänotypische Diversität hat dazu geführt, dass sich Genetiker schon seit langem mit Rassehunden beschäftigen und der Hund ein wichtiges Modelltier für die biomedizinische Grundlagenforschung geworden ist. Bis vor etwa fünf Jahren erfolgte die Identifizierung von Mutationen für erbliche Merkmale bei Hunden praktisch ausschließlich über den Kandidatengenansatz. Der Hund war die erste Haustierspezies für die SNP-Genotypisierungs-Mikroarrays verfügbar wurden (KARLSSON et al. 2007). Dies führte dazu, dass seit einigen Jahren neben dem Kandidatengenansatz auch der positionelle Ansatz zur Aufklärung kausaler Mutationen besonders beim Hund sehr erfolgreich eingesetzt wird.

Ähnlich wie die Nutztierzucht findet auch die Zucht von Rassehunden in weitgehend geschlossenen Populationen statt. Die Zucht innerhalb der Rassen ist durch ein gewisses Ausmaß an Inzucht geprägt. Durch die Inzucht erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass seltene rezessive Allele in einem Individuum zusammentreffen und z. B. als züchterisch erwünschtes Merkmal oder aber eben auch als Erbfehler phänotypisch sichtbar werden. Von allen Haustierspezies weist der Hund die günstigsten Populationsstrukturen für die genetische Forschung auf (PENNISI 2007, KARLSSON und LINDBLAD-TOH 2008). Bei Hunden gibt es heute ca. 400 anerkannte Rassen, von denen die meisten in den letzten 200 Jahren (~100 Generationen) aus ganz wenigen Tieren gegründet wurden (Abb. 1). Somit haben moderne Rassehunde zwei enge genetische Flaschenhälse durchlaufen. Der erste dieser Flaschenhälse war vor etwa 10000–20000 Jahren bei der Domestikation des Haushundes. Damals wurden aus einer relativ großen Population an Wölfen nur ganz wenige Tiere selektiert, aus denen die Haushunde hervorgingen, welche bis in die Neuzeit als eine mehr oder weniger einheitliche Population gezüchtet wurden. Der zweite genetische Flaschenhals kam dann etwa im 19. Jahrhundert als die meisten der heutigen Hunderassen gegründet wurden. Damals wurden wieder nur relativ wenige Hunde ausgewählt, die den Idealvorstellungen der Rasse nahe kamen, und aus diesen wurden die heutigen Hunderassen gezüchtet. Die Vorteile solcher isolierten Populationen für die genetische Forschung sind seit langem bekannt und haben z. B. in der Humangenetik dazu geführt, dass viele bahnbrechende Entdeckungen in den isolierten Populationen Finnlands oder Islands erzielt wurden (PELTONEN et al. 1999).

2. Genomweite Assoziationsstudien

Wie bereits oben ausgeführt, war der Hund die erste Haustierspezies, für die genomweite Assoziationsstudien möglich wurden. Grundvoraussetzung dafür war einerseits die Sequenzierung des Hundegenoms und damit verbunden die Identifizierung von mehr als einer Million variabler Stellen im Hundegenom, sogenannter Einzelbasenaustausche (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP; LINDBLAD-TOH et al. 2005). Die Entwicklung von kostengünstigen Hochdurch-

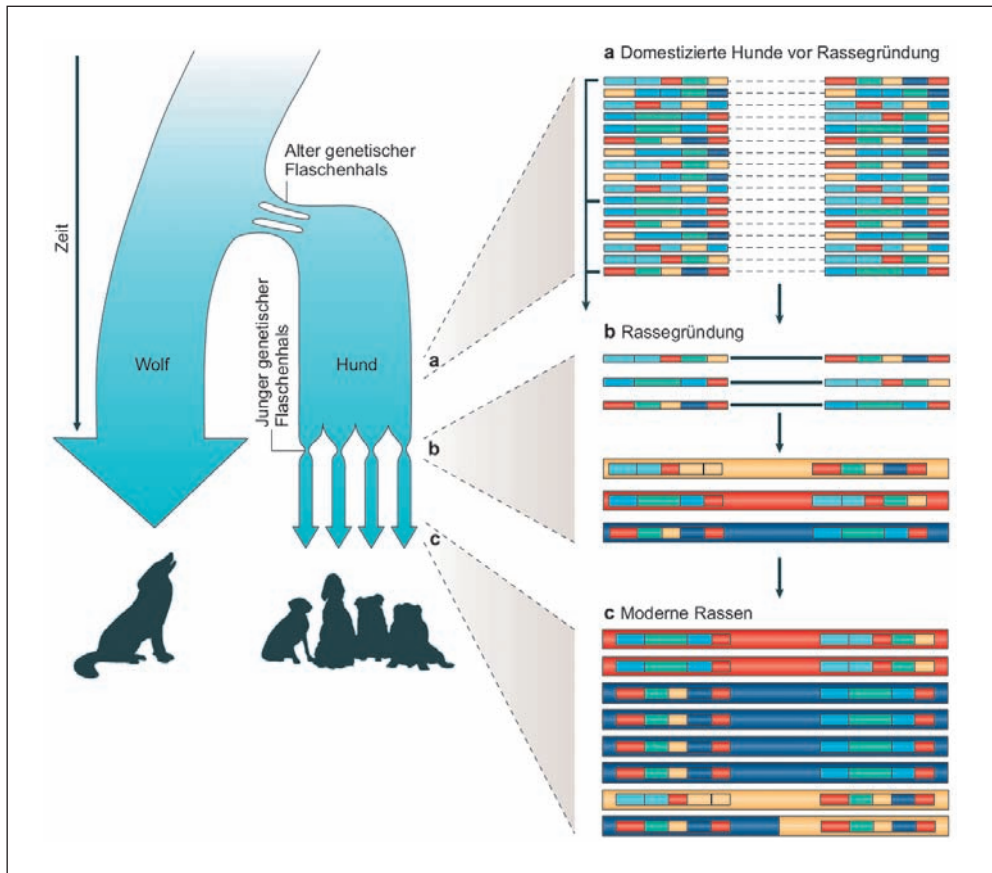


Abb. 1 Haplotypstrukturen in Hundepopulationen. Ein alter und ein junger genetischer Flaschenhals haben zu charakteristischen und für die Forschung äußerst vorteilhaften Haplotypstrukturen geführt. Hunde wurden vermutlich mehrmals unabhängig voneinander vor ca. 10000 – 30000 Jahren aus Wölfen domestiziert. In den letzten zwei Jahrhunderten wurden die modernen Hunderassen jeweils aus wenigen Tieren gegründet. (A) Vor der Rassegründung wies die Hundepopulation relativ kurze Haplotypblöcke auf, die aufgrund der zahlreichen Rekombinationsereignisse seit der Rassegründung entstanden sind. (B) Bei der Rassegründung wurde nur eine kleine Auswahl der vorhandenen Chromosomen selektiert. Da seit der Rassegründung weniger als hundert Generationen verstrichen sind, besteht innerhalb einer Rasse häufig ein ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*) auch zwischen weit entfernten Markern, d.h., innerhalb einer Rasse beobachtet man lange Haplotypblöcke. Somit kann man genomweite Assoziationsstudien innerhalb einer Rasse mit relativ wenigen Markern erfolgreich durchführen. (C) Die kurzen Haplotypblöcke, die seit der Domestikation entstanden sind, werden bei rasseübergreifenden Analysen sichtbar. Dies kann z. B. ausgenutzt werden, um Mutationen, die vor der Trennung der Rassen entstanden sind, sehr präzise zu kartieren, wenn ein erbliches Merkmal in mehreren Rassen auftritt. (Modifiziert aus KARLSSON und LINDBLAD-TOH 2008; mit freundlicher Erlaubnis von Kerstin LINDBLAD-TOH)

satz-Genotypisierungsverfahren mit Hilfe von sogenannten SNP-Mikroarrays war der zweite wichtige Schritt für die Realisierung genomweiter Assoziationsstudien (KARLSSON et al. 2007).

Bei einer genomweiten Assoziationsstudie werden Kohorten von möglichst unverwandten Fällen und Kontrollen analysiert. Die zugrundeliegende Hypothese ist dabei, dass alle Fälle

die kausale genetische Variante von einem gemeinsamen Vorfahren erhalten haben. Da dieser gemeinsame Vorfahre vor vielen Generationen gelebt haben kann, haben zahlreiche Rekombinationsereignisse dafür gesorgt, dass bei den aktuell untersuchten Fällen die Chromosomen in vielfältiger Weise durchmischt wurden. Weil die Anzahl der Rekombinationsereignisse aber trotzdem endlich ist, werden die Fälle in der unmittelbaren Umgebung der kausalen Mutation immer noch die Markerallele des ursprünglichen Chromosoms tragen, auf dem die kausale Mutation passiert ist. Die Tiere der Kontrollkohorte werden dagegen im Bereich der kausalen Mutation alle in der Population vorkommenden Allele tragen. Es hat sich gezeigt, dass innerhalb einer Hunderasse das Kopplungsungleichgewicht (engl. *linkage disequilibrium*, LD) wesentlich weiter als in einer typischen menschlichen Population reicht, daher können genomweite Assoziationsstudien mit wesentlich weniger Markern als beim Menschen durchgeführt werden. Genomweite Assoziationsstudien können in Hunden mit sehr kleinen Tierzahlen durchgeführt werden. Für monogen autosomal rezessive Merkmale werden dafür etwa 10–12 Fälle und ebenso viele Kontrollen benötigt. Für monogen autosomal dominante Merkmale benötigt man jeweils etwa 20–30 Fälle und Kontrollen. Vor Kurzem wurden die ersten Mutationen für eine komplex vererbte Erkrankung mit 81 Fällen und 57 Kontrollen kartiert (WILBE et al. 2010). Daher scheint es im Moment so, als könnten genomweite Assoziationsstudien für komplex vererbte Merkmale beim Hund mit 10–100-mal weniger Proben durchgeführt werden als vergleichbare menschliche Studien. In den folgenden Abschnitten sollen zwei Studien zur Aufklärung monogener Merkmale etwas detaillierter rekapituliert werden.

3. Haarlosigkeit bei Nackthunden

Nackthunde wie die Mexikanischen und Peruanischen Nackthunde oder die Chinesischen Schopfhunde werden seit langem von Menschen gezüchtet (Abb. 2). Eine Figur aus Mittelamerika, die zweifelsfrei einen Nackthund darstellt, wurde auf 1700 v. Chr. datiert. Aufgrund ihres auffälligen Phänotyps klassifizierte Carl von LINNÉ die Nackthunde zunächst sogar als eigenständige Art (LINNAEUS 1758).

Die Vererbung der Haarlosigkeit bei Nackthunden ist monogen autosomal kodominant. Haarlose Hunde sind obligat heterozygot, während das homozygote Vorliegen der ursächlichen Mutation zum Absterben des Embryos in der Trächtigkeit führt (ROBINSON 1985). Nackthunde weisen eine abwesende oder spärliche Behaarung sowie Veränderungen am Gebiss auf. Häufig fehlen Zähne im Gebiss von Nackthunden, und die vorhandenen Zähne können eine veränderte Form aufweisen. Dieser Phänotyp wurde auch als kanine ektodermale Dysplasie (CED) bezeichnet, da die Entwicklung von verschiedenen ektodermalen Strukturen (Haare, Zähne) gestört ist. Ganz ähnliche Phänotypen findet man bei Menschen mit anhidrotischer ektodermaler Dysplasie. Bei den menschlichen Patienten wurden Mutationen in drei verschiedenen Genen des sogenannten Ectodysplasin (EDA)-Signaltransduktionswegs als Ursache identifiziert. Es zeigte sich jedoch bereits vor einigen Jahren, dass bei den Nackthunden keines dieser drei bekannten Kandidatengene mutiert ist (O'BRIEN et al. 2005, SANDER et al. 2005). Daher wurde eine positionelle Strategie verfolgt, um die ursächliche Mutation zu identifizieren. Durch eine Kopplungsanalyse mit Mikrosatellitenmarkern in einer experimentellen Familie konnte die ursächliche Mutation für CED auf dem Chromosom 17 des Hundes kartiert werden (O'BRIEN et al. 2005). Aufgrund der begrenzten Anzahl informativer Meiosen innerhalb dieser experimentellen Familie konnte das kritische Intervall allerdings nur sehr



Abb. 2 Nackthunde. (A) Die „haarlose“ Variante des Chinesischen Schopfhunds weist häufig eine spärliche Restbehaarung am Körper neben der Behaarung am Kopf und den distalen Gliedmaßen auf. (B) Die behaarte Variante des Chinesischen Schopfhunds wird als Powderpuff bezeichnet und weist eine völlig normale Behaarung auf. Nackthunde sind obligat heterozygot für die ursächliche Mutation und können behaarte Nachkommen haben. Das Vorhandensein der Mutation im homozygoten Zustand führt zum Absterben und der Resorption des Embryos während der Trächtigkeit.

grob eingegrenzt werden. Erst mit Hilfe einer genomweiten Assoziationsstudie unter Verwendung von 50 000 Markern an 20 unverwandten haarlosen Chinesischen Schopfhunden und 20 behaarten Hunden dieser Rasse („Powderpuff“) wurde es möglich, die CED-Mutation relativ präzise zu kartieren (DRÖGEMÜLLER et al. 2008). Die genomweite Assoziationsstudie lieferte einen einzigen genomweit signifikant assoziierten SNP auf Chromosom 17. Anschließend wurde ein 2 Mb großes Intervall um diesen assoziierten SNP in einer größeren Anzahl von Hunden feinkartiert. Dazu wurden 111 polymorphe Marker in diesem Intervall an 142 Chinesischen Schopfhunden, 45 Peruanischen Nackthunden und 8 Mexikanischen Nackthunden typisiert. Der detaillierte Vergleich der rekonstruierten Haplotypen dieser Hunde zeigte, dass alle Nackthunde genau eine Kopie eines identischen Haplotypensegments von 102 kb trugen. In diesem Segment befand sich nur ein einziges proteinkodierendes Gen, welches Homologie zu den sogenannten *FOX*-Genen aufwies, die für *forkhead*-Transkriptionsfaktoren kodieren. *Forkhead*-Transkriptionsfaktoren stellen eine Proteinfamilie mit über 50 Mitgliedern dar, die wichtige Signale in der Entwicklung verschiedener Gewebetypen und Organstrukturen vermitteln. Das Gen in der CED-Region bei Nackthunden konnte als orthologes Gen zum murinen *Foxi3*-Gen identifiziert werden, dessen Funktion zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch unbekannt war. Das menschliche *FOXI3*-Gen war damals aufgrund eines Sequenzierungsfehlers im humanen Genomprojekt nicht korrekt annotiert und ebenfalls noch nie experimentell untersucht worden. Mit Hilfe von *In-situ*-Hybridisierungen an Mäuseembryonen konnte gezeigt werden, dass das murine *Foxi3*-Gen sehr spezifisch am 14. Tag der Entwicklung bei der Bildung der Zahnanlagen und am 15. Tag bei der Entstehung der primären Haarfollikel exprimiert wird (DRÖGEMÜLLER et al. 2008). Somit schien das kanine *FOXI3*-

Gen ein sehr aussichtsreicher Kandidat für den CED-Phänotyp bei Nackthunden zu sein, da es sowohl positionell in der richtigen Genomregion lokalisiert als auch funktionell seine Beteiligung bei der Entwicklung ektodermaler Strukturen bestätigt war. Die Sequenzierung des *FOXI3*-Gens zeigte, dass alle Nackthunde eine Duplikation von 7 Basenpaaren aufweisen, welche zu einer Leserahmenverschiebung in der kodierenden Sequenz des *FOXI3*-Gens und somit wahrscheinlich zu einem vollständigen Funktionsverlust des kodierten Proteins führt (DRÖGEMÜLLER et al. 2008). Diese Duplikation führt im heterozygoten Zustand vermutlich aufgrund einer Haploinsuffizienz zur Haarlosigkeit bei Nackthunden und im homozygoten Zustand zum völligen Ausfall des FOXI3-Proteins und damit zur embryonalen Letalität. Diese Studie an Hunden hat also erstmalig eine wichtige Rolle von FOXI3 in der Entwicklung ektodermaler Strukturen aufgezeigt und darüber hinaus dazu geführt, dass das menschliche Gen korrekt annotiert wurde. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob und wie FOXI3 mit den bekannten Proteinen des Ectodysplasine-Signaltransduktionswegs interagiert.

4. Osteogenesis imperfecta bei Hunden

Osteogenesis imperfecta (OI) oder auch Glasknochenkrankheit kommt bei Menschen, Hunden und anderen Haustierspezies vor. Diese Erkrankung wird durch eine fehlerhafte Struktur des Kollagen Typ I verursacht, die sich vor allem in extrem brüchigen Knochen und Zähnen manifestiert. Beim Menschen werden etwa 90 % der Fälle durch Mutationen in den Genen *COL1A1* und *COL1A2* hervorgerufen, welche für die Untereinheiten des Kollagen Typ I kodieren. In der Regel werden Mutationen in den Kollagen-Untereinheiten dominant vererbt. In den letzten Jahren wurden bei einigen menschlichen OI-Patienten Mutationen in zwei weiteren Genen entdeckt, die eine Rolle bei der posttranslationalen Prozessierung der Prokollagene spielen (MORELLO et al. 2006, CABRAL et al. 2007).

Beim Teckel wurde eine OI-Form beschrieben, die monogen autosomal rezessiv vererbt wird (SEELIGER et al. 2003). Die Sequenzierung der *COL1A1*- und *COL1A2*-Gene erbrachte keinen Hinweis auf pathologische Mutationen, und eine Kopplungsanalyse mit Mikrosatelliten in den jeweiligen Genomregionen zeigte, dass diese beiden Gene nicht für die OI beim Teckel verantwortlich waren. Obwohl genomweite Assoziationsstudien beim Hund mit sehr wenig Proben erfolgreich durchgeführt werden können, reichte in diesem Fall die Probenzahl nicht aus, denn es standen nur fünf hochmolekulare DNA-Proben von erkrankten Teckeln zur Verfügung. Einige zusätzliche Proben konnten nicht für die SNP-Genotypisierung auf dem Mikroarray verwendet werden, weil die DNA entweder stark degradiert war oder weil zu wenig DNA für das Experiment zur Verfügung stand. Da eine genomweite Assoziationsstudie nicht durchgeführt werden konnte, wurden jeweils 50 000 SNPs an fünf betroffenen Teckeln, fünf Trägern (d. h. gesunden Eltern von betroffenen Hunden) und fünf unverwandten gesunden Teckeln genotypisiert. Eine Homozygotie-Kartierung ergab, dass die fünf betroffenen Teckel alle homozygot die gleichen Markerallele über mehrere Millionen Basenpaare auf Chromosom 21 trugen (DRÖGEMÜLLER et al. 2009). Der gemeinsame Abschnitt, der bei allen fünf Fällen homozygot war, erstreckte sich über 5,82 Mb. Daraus wurde geschlossen, dass sich die kausale Mutation in diesem Abschnitt befinden musste. Die Haplotypenanalyse der fünf Trägartiere erbrachte eine weitere Reduktion des kritischen Intervalls auf 4,74 Mb. In diesem Intervall befanden sich 98 Gene, unter denen das *SERPINH1*-Gen sofort auffiel, weil SERPINH1, welches auch als Kollagen-bindendes Protein 1 bekannt

ist, eine Rolle bei der korrekten Reifung von Kollagenen spielt. Die Sequenzierung des *SERPINH1*-Gens ergab dann auch folgerichtig, dass das *SERPINH1* aller an OI erkrankten Teckel homozygot einen Aminosäureaustausch in einem evolutionär konservierten Bereich des Proteins aufwies. Eine Modellierung der Proteinstruktur lieferte Anhaltspunkte, dass dieser Aminosäureaustausch zu einer lokalen Strukturveränderung an der Oberfläche des *SERPINH1*-Proteins führt (DRÖGEMÜLLER et al. 2009). Somit konnte in den Teckeln erstmals gezeigt werden, dass Mutationen im *SERPINH1*-Gen zu OI führen können. Inzwischen wurde auch der erste menschliche OI-Patient mit einer *SERPINH1*-Mutation identifiziert (CHRISTIANSEN et al. 2010), was die Bedeutung der genetischen Forschung in Begleittieren für die Humanmedizin eindrücklich belegt.

5. Ausblick

Durch die enormen Fortschritte in der Genomanalyse ist die Aufklärung von Erbfehlern bei Hunden heute sehr viel einfacher geworden. Auch für die anderen Begleittierarten sind ähnliche Entwicklungen zu erwarten. Erbfehler bei Begleittieren können wichtige Erkenntnisse für ähnliche menschliche Erkrankungen liefern, da die Identifizierung der zugrundeliegenden Mutationen aufgrund der günstigeren Populationsstrukturen bei Begleittieren effizienter als bei vergleichbaren menschlichen Phänotypen durchgeführt werden kann. Nach der Aufklärung eines Erbfehlers können entsprechende Gentests zur raschen Eliminierung des Defekts aus den Zuchtpopulationen eingesetzt werden, wodurch eine nachhaltige Verbesserung der Tiergesundheit erreicht wird.

Literatur

- CABRAL, W. A., CHANG, W., BARNES, A. M., WEIS, M., SCOTT, M. A., LEIKIN, S., MAKAREEVA, E., KUZNETSOVA, N. V., ROSENBAUM, K. N., TIFFT, C. J., BULAS, D. I., KOZMA, C., SMITH, P. A., EYRE, D. R., and MARINI, J. C.: Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nature Genet.* 39, 359–365 (2007)
- CHRISTIANSEN, H. E., SCHWARZE, U., PYOTT, S. M., AL SWAID, A., AL BALWI, M., ALRASHEED, S., PEPIN, M. G., WEIS, M. A., EYRE, D. R., and BYERS, P. H.: Homozygosity for a missense mutation in *SERPINH1*, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. *Amer. J. Hum. Genet.* 86, 389–398 (2010)
- DRÖGEMÜLLER, C., BECKER, D., BRUNNER, A., HAASE, B., KIRCHER, P., SEELIGER, F., FEHR, M., BAUMANN, U., LINDBLAD-TOH, K., and LEEB, T.: A missense mutation in the *SERPINH1* gene in Dachshunds with osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet.* 5, e1000579 (2009)
- DRÖGEMÜLLER, C., KARLSSON, E. K., HYTÖNEN, M. K., PERLOSKI, M., DOLF, G., SAINIO, K., LOHL, H., LINDBLAD-TOH, K., and LEEB, T.: A mutation in hairless dogs implicates *FOXI3* in ectodermal development. *Science* 321, 1462 (2008)
- KARLSSON, E. K., BARANOWSKA, I., WADE, C. M., SALMON HILLBERTZ, N. H., ZODY, M. C., ANDERSON, N., BIAGI, T. M., PATTERSON, N., PIELBERG, G. R., KULBOKAS, E. J. 3rd, COMSTOCK, K. E., KELLER, E. T., MESIROV, J. P., EULER, H. VON, KÄMPE, O., HEDHAMMAR, A., LANDER, E. S., ANDERSSON, G., ANDERSSON, L., and LINDBLAD-TOH, K.: Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nature Genet.* 39, 1321–1328 (2007)
- KARLSSON, E. K., and LINDBLAD-TOH, K.: Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. *Nature Rev. Genet.* 9, 713–725 (2008)
- LINDBLAD-TOH, K., WADE, C. M., MIKKELSEN, T. S., KARLSSON, E. K., JAFFE, D. B., et al.: Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803–819 (2005)
- LINNAEUS, C.: *Systema Naturae*. Edition X. Halae Magdeburgicae 1758

- MORELLO, R., BERTIN, T. K., CHEN, Y., HICKS, J., TONACHINI, L., MONTICONE, M., CASTAGNOLA, P., RAUCH, F., GLORIEUX, F. H., VRANKA, J., BÄCHINGER, H. P., PACE, J. M., SCHWARZE, U., BYERS, P. H., WEIS, M., FERNANDES, R. J., EYRE, D. R., YAO, Z., BOYCE, B. F., and LEE, B.: CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* 127, 291–304 (2006)
- O'BRIEN, D. P., JOHNSON, G. S., SCHNABEL, R. D., KHAN, S., COATES, J. R., JOHNSON, G. C., and TAYLOR, J. F.: Genetic mapping of canine multiple system degeneration and ectodermal dysplasia loci. *J. Hered.* 96, 727–734 (2005)
- PELTONEN, L., JALANKO, A., and VARILLO, T.: Molecular genetics of the Finnish disease heritage. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1913–1923 (1999)
- PENNISI, E.: The geneticist's best friend. *Science* 317, 1668–1671 (2007)
- ROBINSON, R.: Chinese crested dog. *J. Hered.* 76, 217–218 (1985)
- SANDER, P., DRÖGEMÜLLER, C., CADIEU, E., ANDRÉ, C., and LEEB, T.: Analysis of the canine EDAR gene and exclusion as a candidate for the hairless phenotype in the Chinese crested dog. *Anim. Genet.* 36, 168–171 (2005)
- SEELIGER, F., LEEB, T., PETERS, M., BRUGMANN, M., FEHR, M., and HEWICKER-TRAUTWEIN, M.: Osteogenesis imperfecta in two litters of dachshunds. *Vet. Pathol.* 40, 530–539 (2003)
- WILBE, M., JOKINEN, P., TRUVÉ, K., SEPPALA, E. H., KARLSSON, E. K., BIAGI, T., HUGHES, A., BANNASCH, D., ANDERSSON, G., HANSSON-HAMLIN, H., LOHI, H., and LINDBLAD-TOH, K.: Genome-wide association mapping identifies multiple loci for a canine SLE-related disease complex. *Nature Genet.* 42, 250–254 (2010)

Prof. Dr. Tosso LEEB
Institut für Genetik
Vetsuisse-Fakultät
Universität Bern
Bremgartenstrasse 109a
3001 Bern
Schweiz
Tel.: +41 31 6312326
Fax: +41 31 631 2640
E-Mail: Tosso.Leeb@itz.unibe.ch

Resistenz und Suszeptibilität gegen Krankheiten

Sven KÖNIG (Witzenhausen)

Mit 3 Abbildungen und 3 Tabellen

Zusammenfassung

Zur Zucht auf Krankheitsresistenz bzw. zur Zucht auf Gesundheitsmerkmale beim Milchrind sind für Infektionskrankheiten als auch für funktionale Erkrankungen verschiedene erfolgversprechende Strategien möglich. Selektionsexperimente in Skandinavien über einen Zeitraum von 30 Jahren für Zucht auf Mastitisresistenz als auch Zuchtplanungsrechnungen in der Deutschen Holstein-Population für die Zucht auf Widerstandsfähigkeit gegen Laminitis zeigen, dass eine direkte und konsequente Selektion auf das jeweilige Gesundheitsmerkmal auch für Merkmale mit niedriger Heritabilität zum gewünschten Erfolg auf phänotypischer Ebene führen kann. Die Suche nach Genen oder QTL für Gesundheitsmerkmale muss in der retrospektiven Betrachtung als eher ernüchternd bewertet werden. Erfolgsversprechende Möglichkeiten für die Zucht auf Krankheitsresistenz ergeben sich durch die Kombination von Phänotypen und genomischen Zuchtwerten. Hier konnte u. a. gezeigt werden, dass für ein Merkmal mit einer Heritabilität von 0,10 und einer Genauigkeit des genomischen Zuchtwerts von 0,70 weiterhin 32 Töchterleistungen erforderlich sind, um eine Genauigkeit des Bullenzuchtwerts von 0,80 zu realisieren. Strukturgleichungsmodelle zur Abschätzung von Antagonismen zwischen Produktionsmerkmalen und Gesundheitsmerkmalen wurden im quantitativen genetischen Kontext behandelt, bieten aber auch die Möglichkeit, neue Selektionsinstrumente wie Genexpressionen oder Biomarker miteinander zu kombinieren. Erste Ansätze hierzu gibt es in der Humangenetik, und sie sollten für eine erfolgreiche Zucht auf Gesundheitsmerkmale beim Nutztier evaluiert und entsprechend modifiziert werden.

Abstract

Breeding for disease resistance or improved animal health in farm animals is practicable both for infectious diseases and functional diseases. Selection experiments in Scandinavia for a period of more than 30 years, and model calculations regarding breeding for resistance against laminitis in the German Holstein population have shown that a systematic, direct selection on health traits with low heritabilities can be successful even on the phenotypic scale. In contrast, from a retrospective point of view it is apparent, that detection of genes or QTL for health traits was of minor success. Promising results for breeding for disease resistance can be obtained due to the combined consideration of phenotypes and genomic breeding values. To give one example, it has been shown that for a desired accuracy of 0,80 for a bull's breeding value, a heritability of 0,10, and an accuracy of the genomic breeding value of 0,70, at least 32 daughters have to be included in genetic evaluation. Structural equation models have been applied in a quantitative genetic approach to infer antagonistic relationships between production and health traits. Such models also have the potential to combine relatively new selection instruments like gene expressions or biomarkers. First attempts to include these new selection instruments have been presented for health traits in human genetics, which also should be evaluated and adapted for breeding for disease resistance in farm animals.

1. Einleitung

Suszeptibilität ist die Empfänglichkeit oder Anfälligkeit eines Wirtes für einen bestimmten Erreger. Resistenz ist der Gegenbegriff zur Suszeptibilität. Im tierzüchterischen Kontext fo-

kussieren die Begriffe Suszeptibilität und Resistenz auf den Aspekt der Tiergesundheit. Tiergesundheit ist gegenwärtig einer der wichtigsten Merkmalskomplexe in der Nutztierzüchtung. Dieser Einschätzung zugrunde liegen Aspekte des Tierschutzes, des Verbraucherschutzes und der Ökonomie (u. a. BISHOP et al. 2002). Tiergesundheit in allen Nutztierarten ist somit ein immanentes Zuchtziel, dessen Verfolgung allerdings aus methodisch-züchterischer Sicht keineswegs trivial ist und für verschiedene Krankheiten verschiedene Strategien erfordert.

SIMIANER und KÖNIG (2002) kategorisierten Krankheiten beim Nutztier in (a.) Infektionskrankheiten, (b.) in Anomalien und genetische Defekte und (c.) in funktionale Erkrankungen. Bei der Klassifizierung der Krankheiten sind aber die Grenzen häufig fließend. So wirkt z. B. an der Entstehung der typischen Infektionskrankheit Mastitis beim Rind häufig eine funktionale Überbeanspruchung des Euters mit, die dann zu einer Lockerung des Zitzenschließmuskels führt, welche das Eindringen der pathogenen Keime in das Euter erleichtert (LEFCOURT 1982). Im Gegensatz zu einigen bedeutenden Anomalien und genetischen Defekten (Erbkrankheiten), wo verantwortliche Anlageträger frühzeitig mittels molekulargenetischer Methoden diagnostiziert werden können (WIMMERS 2007), sind Infektionskrankheiten bzw. funktionale Erkrankungen in der Regel multifaktoriell und polygen bedingt. Generell ist es möglich, für die relevanten Krankheiten im Nutztierbereich eine genetische Komponente zu schätzen. Die Heritabilitäten sind aber meist sehr niedrig, was zum einen auf den permanenten Selektionsdruck, der gegen Krankheitsanfälligkeit wirkt, und zum anderen auf die Abhängigkeit der Krankheitsausprägung von der Umweltgestaltung, zurückzuführen ist. Dennoch gibt es zahlreiche Beispiele im Nutztierbereich, wo basierend auf umfangreicher und sorgfältiger Dokumentation von Krankheit zuzüglich konsequenter Selektionsstrategien, d. h. der Implementierung der jeweiligen Merkmale mit entsprechend hohem ökonomischem Gewicht im Zuchtziel, deutliche Fortschritte in der Population realisiert werden konnten.

Der vorliegende Beitrag beschäftigt sich mit Infektionskrankheiten und funktionalen Erkrankungen beim Milchrind, die im engen Kontext zu sehen sind. Infektionskrankheiten werden durch biotische Erreger übertragen. Das wohl bekannteste Beispiel im Milchrinderbereich ist die Mastitis, für die als Erreger Bakterien, Pilze und sogar Algen gefunden werden (BARKEMA et al. 2009). Der derzeit am häufigsten vorkommende Mastitiserreger ist das Bakterium *Staphylococcus aureus* (u. a. REKSEN et al. 2006). Mastitis kann aber auch aufgrund einer durch eine funktionale Überbeanspruchung der Tiere bzw. als Ergebnis einer für die geforderte Leistung unzureichenden Umweltgestaltung (z. B. Haltung, Fütterung) resultieren (u. a. SATO et al. 2008). Weitere funktionale Erkrankungen infolge einer Überbeanspruchung, insbesondere zu Laktationsbeginn, sind Stoffwechselentgleisungen wie Ketose oder Milchfieber (GOFF und HORST 1997). Die Folgen unzureichender Umweltgestaltungen in Milchviehställen sind in einer Vielzahl von Studien als Ursache von Klauen- und Fundamentproblemen mit einer letztendlich verkürzten Länge des produktiven Lebens der Milchkuh nachgewiesen worden (u. a. BUENGER et al. 2001).

Der vorliegende Beitrag konzentriert sich auf die Thematik ‚Zucht auf Gesundheitsmerkmale beim Milchrind‘ in ihrer ganzen Vielschichtigkeit. Ein in Skandinavien durchgeführtes Selektionsexperiment beim Milchrind soll illustrieren, welcher Erfolg auf phänotypischer Ebene bei konsequenter Selektion auf Krankheitsresistenz zu erwarten ist. Daran anknüpfend werden eigene Untersuchungen zur Zucht auf Klauengesundheit und Zuchtplanungsrechnungen zur Widerstandsfähigkeit gegen Laminitis vorgestellt. Der zweite Teil dieser Studie behandelt die Nutzung und Implementierung molekulargenetischer Informationen zur Verbesserung von Gesundheitsmerkmalen in Milchrinderzuchtprogrammen. In den späten 1980er

und 1990er Jahren standen hierbei Untersuchungen zur Lokalisierung sogenannter QTL (= *Quantitative Trait Loci*) im Fokus. Hochdurchsatztypisierungen mittels 50K SNP-Technologie erlauben heutzutage unter der Annahme des infinitesimalen Modells die Schätzung genomischer Zuchtwerte (u. a. MEUWISSEN et al. 2001) und genombasierte Selektionsverfahren (u. a. SCHAEFFER 2006). Zuchtplanungsrechnungen mittels Selektionsindextheorie sollen hierbei praktische Fragestellungen zum Prüfdesign für Bullenmütter und zum Testdesign für Jungbullen mit Fokus auf niedrig erbliche Gesundheitsmerkmale beantworten.

2. Zucht auf Gesundheitsmerkmale: quantitativ genetische Ansätze

2.1 Das Selektionsexperiment in Skandinavien

Die meisten skandinavischen Länder verfolgen traditionell eine konsequente Zucht auf Eutergesundheit in den jeweiligen Rinderpopulationen (HERINGSTAD et al. 2000). Dabei wird eine systematische und qualitativ hochwertige Merkmalserfassung mit einer entsprechenden Gewichtung der Eutergesundheit im Zuchtziel kombiniert. In Norwegen werden alle tierärztlichen Behandlungen auf sogenannten ‚Gesundheitskarten‘ seit 1975 tierindividuell erfasst und für die nationale Zuchtwertschätzung zur Verfügung gestellt. Aktuell sind ca. 98 % aller in der Milchleistungsprüfung registrierten Kühe Norwegens auch in der Gesundheitsdatenbank erfasst. Schweden implementierte ein ähnliches System im Jahre 1982 (GRÖHN et al. 1986). Aufgrund der größten wirtschaftlichen Bedeutung konzentrierte sich eine Vielzahl von genetisch statistischen Analysen auf das Merkmal klinische Mastitis. Die geschätzten Heritabilitäten lagen aber durchweg auf niedrigem Niveau, im Bereich von 0,02 bis 0,06, wenn lineare Modelle verwendet wurden (u. a. HERINGSTAD et al. 1997). Geringfügig höhere Werte im Bereich von 0,06 bis 0,12 auf der zugrundeliegenden Anfälligkeitsskala wurden mittels Schwellenwertmethodik realisiert (u. a. SIMIANER et al. 1991). Die sukzessiv wachsende Gesundheitsdatenbank ermöglichte in späteren Jahren auch eine Schätzung genetischer Parameter für Merkmale mit niedrigeren Krankheitsinzidenzen. HERINGSTAD et al. (2005) nutzen einen substanziellen Datenpool von insgesamt 372 227 Kühen in der ersten Laktation und Bayesian-Statistik zur Schätzung von Varianzkomponenten für die Merkmale MilCHFieber, Ketose und Nachgeburtverhalten. Auch hier lag der Anteil der additiv genetischen an der Gesamtvarianz unter 10 %.

Im Jahre 1978 wurde in Norwegen ein großes Selektionsexperiment initiiert, um die Folgen konsequenter Zuchtstrategien für Gesundheitsmerkmale auf phänotypischer Ebene quantifizieren zu können. Von 1978 bis 1989 wurden zwei Selektionsgruppen definiert: Selektion auf hohe Milchmenge (Selektionsgruppe HMP) bzw. Selektion auf niedrige Milchmenge (Selektionsgruppe LMP). In 1989 kamen zwei weitere Selektionsgruppen hinzu: Selektion auf hohe Eiweißkilogramm (Selektionsgruppe HPY) und Selektion auf niedrige Krankheitsinzidenz für klinische Mastitis (LCM). Hierzu wurden für Anpaarungen in den einzelnen Selektionsgruppen die besten bzw. schlechtesten Bullen nach Zuchtwert im jeweiligen Merkmal verwendet. Die finale Auswertung erfolgte im Jahre 2007 (HERINGSTAD et al. 2007). Trotz der niedrigen Heritabilitäten war mit der strengen Selektion auf ein Gesundheitsmerkmal (LCM) ein deutlicher phänotypischer Trend in die gewünschte Richtung assoziiert. Kühe in der LCM-Gruppe hatten auch deutlich niedrigere Krankheitsinzidenzen für die Merkmale Ketose und Nachgeburtverhalten, verglichen mit Kühen der Gruppen HPY oder HMP. Somit ist Zucht auf Krankheitsresistenz möglich, sofern sie denn konsequent in ein Zuchtprogramm implementiert wird.

2.2 Zucht auf Klauengesundheit in Deutschland

Ein funktionierendes System, von der Datenerfassung auf dem landwirtschaftlichen Betrieb bis zur Zuchtwertschätzung und Zuchtplanung, impliziert die Zusammenarbeit verschiedenster Institutionen. Hierzu wurde am Göttinger Tierzuchtinstitut im Jahre 2004 unter Beteiligung der Klauenpflegergenossenschaft Sachsen mit Sitz in Lohmen, der LVA Echem, der dsp Agrosoft GmbH Paretz, der DLG Frankfurt, der Universität Göttingen und nicht zuletzt der milchkuhhaltenden Betriebe eine Projektarbeit begonnen, welche im weiteren Verlauf verschiedenste Fragestellungen zur Zucht auf Klauengesundheit beantworten konnte.

In Anlehnung an praktische Erfahrungen und internationale Untersuchungen erfolgte im DLG-Arbeitsausschuss für Klauenpflege und Klauenhygiene vorab eine Verständigung auf einen einheitlichen Diagnoseschlüssel für insgesamt acht Unterfußkrankungen mit möglichen Feinabstufungen einzelner Krankheiten (FIEDLER et al. 2008). Diese Erkrankungen werden beim Klauenschnitt schriftlich oder mittels Dokumentationssoftware in elektronischer Form erfasst. Die elektronische Dokumentation hat den Vorteil, dass neben den Befunden weitere betriebstypische, auf die Klauengesundheit einwirkende Faktoren, zügig erfasst und zusätzliche Daten, z. B. Leistungsinformationen oder die Identifikation der Kühe aus Herdenmanagementprogrammen, eingespeist werden können. Des Weiteren ist es kürzlich gelungen, eine Schnittstelle zwischen Dokumentationssoftware und gängigen Statistikprogrammen zu etablieren, so dass von üblichen Routineauswertungen bis hin zur Zuchtwertschätzung für einzelne Klauenerkrankungen effizient gearbeitet werden kann.

Ein Schwerpunkt der genetisch statistischen Analyse war die Aufklärung des Antagonismus zwischen Klauenerkrankungen und Milchmenge. Hierzu wurden sogenannte Strukturgleichungsmodelle mit *Feed-back*-Wirkungen, die Rückkoppelungseffekte zwischen Merkmalen berücksichtigen (GIANOLA und SORENSEN 2004), für die zu bearbeitende Fragestellung angepasst. Von KÖNIG et al. (2008) wurde Schwellenwertmethodik innerhalb eines Strukturgleichungsmodells implementiert, um den Effekt eines Produktionsmerkmals (Testtagmilchmenge vom ersten Probegemelk nach der Kalbung = MY1) auf ein Gesundheitsmerkmal (Klauenerkrankung = CD), als auch den antizipierten rekursiven Effekt von CD auf MY2 (= das am nächsten gelegene Testtagsgemelk nach einer Erkrankung) zu quantifizieren.

Das verwendete statistische rekursive Modell war in Matrixschreibweise wie folgt definiert:

$$\begin{pmatrix} \Lambda \mathbf{y}_1 \\ \Lambda \mathbf{y}_2 \\ \dots \\ \Lambda \mathbf{y}_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{X}_1 \\ \mathbf{X}_2 \\ \dots \\ \mathbf{X}_n \end{pmatrix} \boldsymbol{\beta} + \begin{pmatrix} \mathbf{Z}_1 \\ \mathbf{Z}_2 \\ \dots \\ \mathbf{Z}_n \end{pmatrix} \mathbf{u} + \begin{pmatrix} \mathbf{e}_1 \\ \mathbf{e}_2 \\ \dots \\ \mathbf{e}_n \end{pmatrix} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{u} + \mathbf{e} \quad [1]$$

Dabei beschreibt $i = 1, 2, \dots, n$ die Kühe, welche für jedes der drei Merkmale eine phänotypische Beobachtung $\mathbf{y}_i$ aufweisen. Der Vektor $\boldsymbol{\beta}$ steht für die fixen Effekte, und $\mathbf{X}_i$ ist die zugehörige Inzidenzmatrix. Da ein Vatermodell gerechnet wurde, beinhaltet Vektor $\mathbf{u}$ die geschätzten Bulleneffekte mit $\mathbf{Z}$ als zugehöriger Inzidenzmatrix. Die entscheidende Besonderheit des rekursiven Modells verglichen mit einem ‚normalen‘ linearen Modell besteht darin, dass jede Beobachtung y_i mit einer Matrix Λ der Dimension 3×3 prämultipliziert wird. Diese Matrix Λ beinhaltet die unbekannten Koeffizienten l_{ij} , welche die Änderungsraten eines

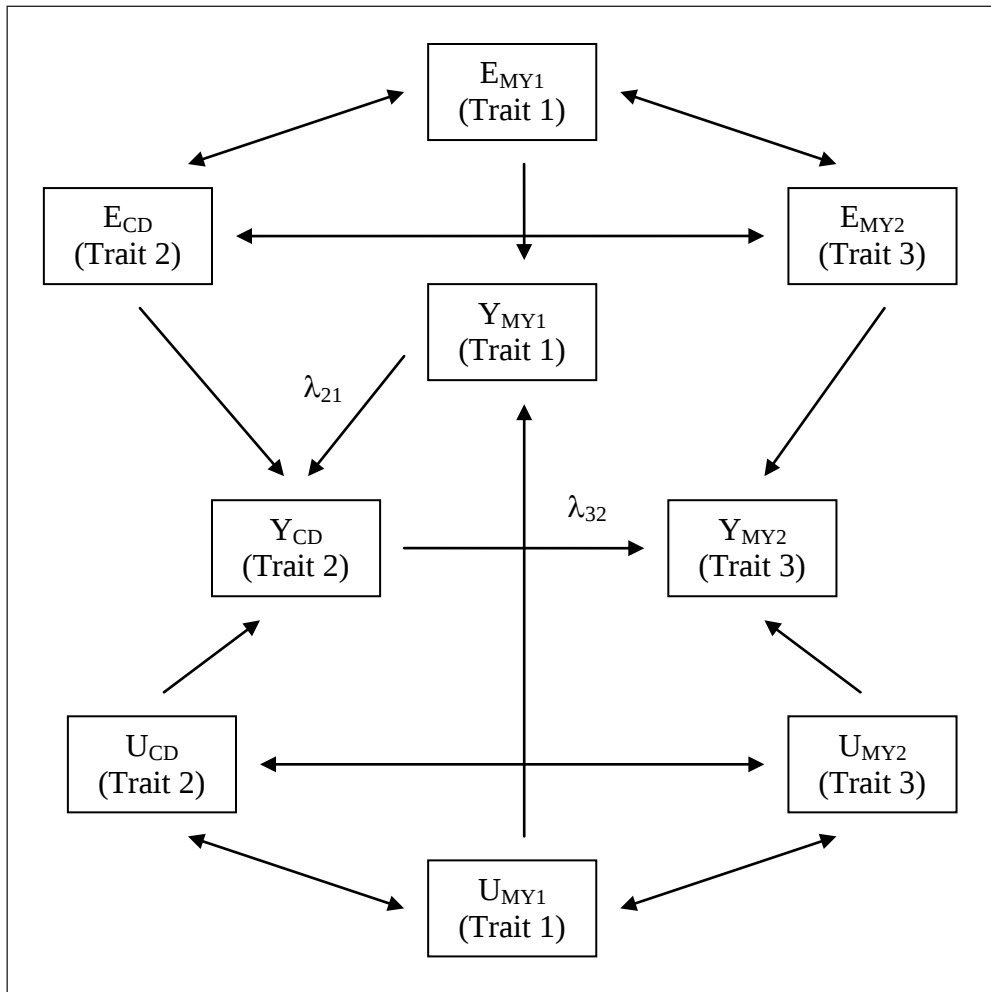


Abb. 1 Rekursives Strukturgleichungsmodell für 3 Merkmale: MY1 = Testtagsgemerkel zeitlich vor einer diagnostizierten Klauenerkrankung, CD = Klauenerkrankung, MY2 = Testtagsgemerkel zeitlich nach einer diagnostizierten Klauenerkrankung. (Y = phänotypische Werte der Merkmale, E = Umwelteffekte, U = additiv genetische Effekte, λ_{ij} Änderungsrate der Variable i in Abhängigkeit der Änderungsrate von Variable j auf phänotypischer Skala).

Merkmals i in Abhängigkeit der Änderung eines Merkmal j beschreiben. Die Form von Λ für die hier definierte Problemstellung war

$$\Lambda = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ -\lambda_{21} & 1 & 0 \\ 0 & -\lambda_{32} & 1 \end{bmatrix} \quad [2]$$

unter Berücksichtigung der phänotypischen Änderungsraten der Merkmale konnten somit genetische Parameter geschätzt werden.

Im zentralen Ergebnis konnte festgestellt werden, dass sowohl auf phänotypischer als auch auf genetischer Ebene eine hohe Einsatzleistung nach der Kalbung die Wahrscheinlichkeit erhöht, an der Klaue zu erkranken. Die Koeffizienten λ_{21} für die Merkmale Sohlengeschwüre, Limax, Wandläsionen und Dermatitis digitalis lagen im Bereich von 0,016 bis 0,042 oder in anderen Worten ausgedrückt: 1 kg höhere Einsatzleistung erhöht die Wahrscheinlichkeit für die Infektionskrankheit Dermatitis digitalis um 4,2 %. Der genetische Antagonismus manifestierte sich in genetischen Korrelationen im Bereich von 0,26 (Limax) bis 0,42 (Dermatitis digitalis).

Zuchtplanungsrechnungen für das Merkmal ‚Widerstandsfähigkeit gegen Laminitis‘ wurden gemeinsam mit der Arbeitsgruppe für Tierzucht der Universität Halle durchgeführt (KÖNIG und SWALVE 2006). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in mehreren Szenarien mittels Indexkalkulationen aufzuzeigen, welche Züchtungsstrategie zur substanziellen Verbesserung der Klauengesundheit in der deutschen Holstein-Population verfolgt werden sollte. Dabei erfolgte eine Konzentration auf die mit Abstand bedeutendste Erkrankung der Rinderklaue, die Laminitis (Klauenrehe). Insgesamt sind hinsichtlich der Merkmale des Fundaments für die deutsche Holstein-Population mittlerweile drei unterschiedliche Datenquellen verfügbar, die in sehr unterschiedlichem Ausmaß als Leistungsprüfung auftreten:

- Die Exterieurklassifizierung von Jungkühen, welche vier linear beschriebene Merkmale sowie eine Fundamentnote beinhalten und die einen Umfang von ca. 15 bis 20 % aller MLP-registrierten Jungkühe ausmacht;
- die Klauenmessung an Jungbullen auf insgesamt vier Aufzuchtstationen von KB-Organisationen; sowie
- die in Pilotprojekten erfolgreich getestete Erfassung von Befunden beim Klauenschnitt.

Um den Selektionserfolg im Merkmal Laminitis quantifizieren zu können, wurden unter Berücksichtigung praxisrelevanter Zuchtprogrammstrukturen Klauenmessungen der genannten drei Leistungsprüfungen als Informationsquellen kombiniert.

Um die Varianz-Kovarianz-Strukturen der Indexmerkmale in einem überschaubaren Rahmen zu belassen, wurde eine selektive Auswahl der Exterieurmerkmale der Kühe und der Klauenmaße der Jungbullen getroffen. Bei dieser Auswahl wurde vom züchterisch günstigsten Szenario ausgegangen, d. h., es wurden die Merkmale Sprunggelenk (SPR) der Kühe und Härte der hinteren Dorsalwand (HOH) der Jungbullen aus dem gesamten Datenpool extrahiert, da diese Merkmale sowohl untereinander als auch zur Laminitis deutlich positiv korreliert sind. Die genetischen und phänotypischen Parameter, wie sie für die Selektionsindexberechnungen verwendet wurden, sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tab. 1 Heritabilitäten (Diagonalelemente), genetische (oberhalb der Diagonalen) und phänotypische Korrelationen (unterhalb der Diagonalen) für die Merkmale im Index

	Laminitis	Sprunggelenk (SPR)	Dorsalwandhärte (HOH)
Laminitis	0,14	0,41	0,44
Sprunggelenk	0,09	0,16	0,29
Dorsalwandhärte	0,05	0,11	0,12

Für die Indexkalkulationen sollten der Zuchtpraxis möglichst nahekommende Szenarien abgebildet werden. Eine substanzielle Verbesserung der Klauengesundheit in der Population ist

am ehesten dann zu erreichen, wenn über den Einsatz der Besamungsbullen nach Merkmalen der Klauengesundheit direkt selektiert werden kann. Als einziges Merkmal im Zuchtwert wurde daher das Merkmal Widerstandsfähigkeit gegen Laminitis für den Bullen definiert. Als Informationsquellen für die Zuchtwertschätzung Laminitis eines Bullen und somit als Indexmerkmale wurden die Laminitisbefunde und die Exterieurbeurteilungen seiner Töchter für das Merkmal Sprunggelenk und als Eigenleistung des Bullen seine Härtemessung an der hinteren Dorsalwand einbezogen. Die Anzahl der beurteilten Töchter je Bulle für die Merkmale Laminitis und Sprunggelenk wurde in praxisrelevanten Szenarien variiert (Tab. 2).

Tab. 2 Genauigkeit (r_{TI}) der Zuchtwertschätzung und Bedeutung der Indexmerkmale (r_{VI} in %) unter verschiedenen Informationsszenarien für das Zielmerkmal „Widerstandsfähigkeit gegen Laminitis“

Szenario	r_{TI}	Bedeutung der Indexmerkmale im Zuchtwert (r_{VI} in %)				
		Eigenleistung Bulle Härtemessung (HOH)	Töchterleistungen Sprunggelenk (SPR)		Töchterleistungen Laminitisbefundung	
		n = 1	n	r_{VI}	n	r_{VI}
A1	0,34	–	50	100,00	0	–
A2	0,37	–	100	100,00	0	–
B1	0,36	6,24	50	57,61	0	–
B2	0,58	1,33	50	9,21	10	38,19
B3	0,68	0,62	50	4,16	20	47,36
B4	0,81	0,17	50	1,13	50	55,83
C1	0,80	–	0	–	50	100,00
C2	0,81	0,23	0	–	50	81,06
C3	0,81	0,19	20	0,74	50	62,11
C4	0,82	0,17	100	1,36	50	52,54

Die Szenarien A1 und A2 bilden die aktuelle Situation ab. Als Informationsquellen für die Zuchtwertschätzung Laminitis werden in diesem Szenario lediglich die Anzahl der linear beurteilten Töchter im Merkmal Sprunggelenk variiert. In den Szenarien B1 bis B4 bleibt die Anzahl der im Sprunggelenk beurteilten Töchter mit 50 und die Eigenleistung des Bullen konstant, während die Anzahl der Töchter mit Laminitisbefunden von 0 bis 50 variiert wird. In den mit C gekennzeichneten Szenarien wird unterstellt, dass in Zukunft routinemäßig die Laminitisbefunde von 50 Töchtern erfasst werden. Um den Erfolg der verschiedenen Züchtungsstrategien beurteilen zu können, werden im Ergebnis die Genauigkeit der Zuchtwertschätzung (r_{TI}), der Zuchtfortschritt im Merkmal Laminitis pro Generation (DG) und die Bedeutung der einzelnen Indexmerkmale am Zuchtfortschritt (r_{VI}) diskutiert (Tab. 2 und Abb. 2). Der Wert r_{VI} (in %) gibt konkret an, welcher Verlust im Zuchtfortschritt für Laminitis zu erwarten ist, wenn das entsprechende Indexmerkmal als Informationsquelle eliminiert wird.

Als eindeutiges Ergebnis bleibt festzuhalten, dass ohne die Berücksichtigung der Laminitisbefunde der Töchter die Genauigkeit der Zuchtwertschätzung für einen Bullen im Merkmal Laminitis unter selbst optimistischen Zuchtprogrammstrukturen mit 100 linear bewerteten Töchtern im Merkmal Sprunggelenk nicht über 0,37 steigt. Auch die Einbeziehung des Merkmals HOH führt nur zu marginalem Genauigkeitsgewinn (Szenario B1). Werden dagegen 10, 20 oder gar 50 Töchter mit Laminitisbefunden als Informationsquellen berücksichtigt, so

steigt die Genauigkeit der Zuchtwertschätzung von 0,58 auf 0,68 bis zu 0,81 an. Der Gewinn an Genauigkeit unter zusätzlicher Berücksichtigung der Messungen von Jungbullen und linearen Beurteilungsergebnissen der Töchter, wenn von bereits 50 Töchtern Laminitisbefunde vorliegen, ist unbedeutend (Szenarien C1 bis C4). Was für die Genauigkeit der Zuchtwertschätzung gesagt wurde, gilt gleichermaßen für die Bedeutung der einzelnen Merkmale im Zuchtwert (r_{VI} in %). Der gegenwärtige Zuchtfortschritt wird um weniger als einen Prozentpunkt vermindert, wenn bereits 50 Töchter mit Laminitisbefunden vorliegen und die beiden übrigen Indexquellen eliminiert werden. Unter der theoretischen Betrachtung, dass Laminitis das alleinige Merkmal im Zuchtziel ist, kann die Laminitisinzidenz pro Generation im günstigsten Szenario C4 um maximal 14 % vermindert werden (Abb. 2). Dieser Zuchtfortschritt wird aber auch annähernd erreicht, wenn auf die Integration der Eigenleistungsmessergebnisse der Jungbullen und die lineare Exterieurbeurteilung der Töchter im Index vollständig verzichtet wird (Szenario C1). Bleiben dagegen die Laminitisbefunde der Töchter als Informationsquelle im Index außen vor, so verringert sich der Zuchtfortschritt pro Generation um mehr als die Hälfte, wie in den Szenarien A1, A2 und B1 deutlich wird.

3. Zucht auf Gesundheitsmerkmale: Nutzung molekulargenetischer Information

3.1 Gene und QTL

Der Begriff des QTL (*Quantitative Trait Locus*) wurde von GELDERMANN (1975) initiiert und beschreibt ein Segment genomischer DNA, welches ein quantitatives Merkmal beeinflusst. Mittels Kopplungs- und Segregationsanalysen wurde seit nunmehr gut 20 Jahren in einer Vielzahl, zum Teil recht aufwendiger, Versuchsdesigns nach Genen geforscht, die einen signifikanten Einfluss auf quantitative Merkmale haben. Dabei ist nur in den seltensten Fällen das Gen direkt gefunden worden, sondern vielmehr sogenannte genetische Marker, die in unmittelbarer Nachbarschaft zum eigentlichen Gen auf dem Chromosom lokalisiert sind und mittels molekulargenetischer Diagnostik im Labor identifiziert werden können. Die indirekt über molekulare Marker gefundenen QTL sind in der Studie von KHATKAR et al. (2004) zusammengefasst. Leider ist hier zu konstatieren, dass es sich vornehmlich um Produktionsmerkmale handelt und es aus genetisch statischer Sichtweise deutlich schwieriger ist, QTL für niedrige erbliche Gesundheitsmerkmale zu finden. Unter den Gesundheitsmerkmalen dominieren gefundene QTL für das Merkmal klinische Mastitis (u. a. RUPP und BOICHARD 2003, LUND et al. 2007), einige wenige wurden für den Komplex der Klauenerkrankungen (u. a. BUITENHUIS et al. 2007) festgestellt, und relativ selten sind sie für Merkmale wie Ketose (u. a. HOLMBERG und ANDERSSON-EKKLUND 2004). Generell ist die Anwendung von QTL für die praktische Selektion limitiert, da die meisten gefundenen QTL nur kleine Effekte erklären, die weniger als 5 % der phänotypischen Standardabweichung des jeweiligen Merkmals betragen (HAYES und GODDARD 2001). Darüber hinaus befinden sich in den meisten Fällen Marker und QTL in einem Kopplungsungleichgewicht, das nur innerhalb von Familien gilt (= LE-Marker) und daher nicht für eine generelle populationsweite Selektionsstrategie Anwendung finden kann (DEKKERS 2004).

3.2 Genomische Selektion und genomische Zuchtplanung

Dass ein substanzieller Zuchtfortschritt für niedrig erbliche Gesundheitsmerkmale nur dann erreicht werden kann, wenn diese Gesundheitsmerkmale auch an den Töchtern der Bullen

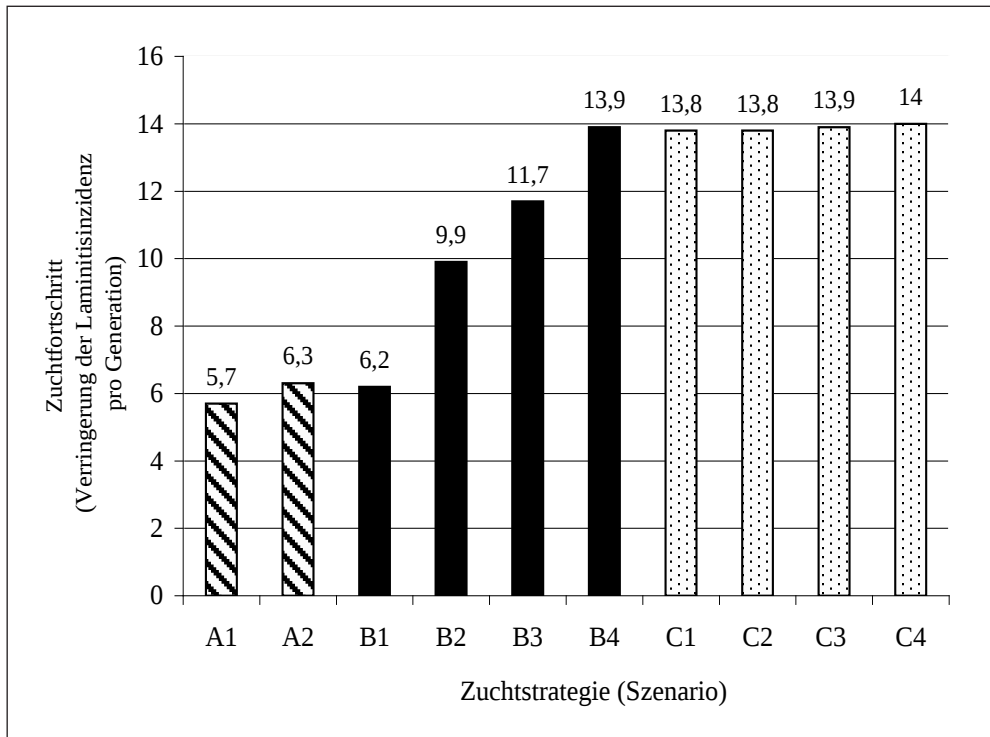


Abb. 2 Zuchtfortschritt pro Generation im Merkmal „Widerstandsfähigkeit gegen Laminitis“ für verschiedene Informationsszenarien

erhoben werden, konnte im Abschnitt 2.2 nachgewiesen werden. Hier wurde vorgeschlagen, dass mindestens 50 Töchter je Bulle für das Merkmal Klauenreife in der Zuchtwertschätzung berücksichtigt werden sollten und dann sogar auf die Exterieurbeurteilung von Hilfsmerkmalen des Fundaments verzichtet werden kann.

Aktuelle Untersuchungen von KÖNIG und SWALVE (2009) greifen diesen Ansatz wieder auf, allerdings unter Berücksichtigung von Typisierungsergebnissen als zusätzliche Informationsquelle im Selektionsindex. Denn es sind insbesondere die Merkmale mit niedriger Erblichkeit, die von genomischer Information profitieren werden (LANDE und THOMPSON 1990) und die somit Testherdensystemen, die deren genaue Erfassung garantieren, neue Impulse verleihen. Bezug nehmend auf den theoretischen Ansatz von DEKKERS (2006) sowie FALCONER und MACKAY (1996) wurden von KÖNIG und SWALVE (2009) Indexgleichungen für einen Bullen aufgestellt, die eine Evaluierung der Bedeutung genomischer Information (= Typisierungsergebnis des Jungbullens) in Relation zu seinen verfügbaren Töchterleistungen zulassen. Neben der Variation der Anzahl Töchter wurden in verschiedenen Szenarien auch die Genauigkeiten der genomischen Zuchtwerte und die Heritabilität des Merkmals variiert. Die entscheidenden Kriterien, wenn darüber entschieden werden soll, wie viel Töchter pro Bulle berücksichtigt werden sollen (Tab. 3), sind somit die Erblichkeit des Merkmals und die Genauigkeit der genomischen Zuchtwertschätzung (rMG). Wenn es wirklich gelingen würde, Genauigkeiten der genomischen Zuchtwerte von mindestens $rMG = 0,9$ zu realisieren, dann

könnte logischerweise für die Zielvorgabe „Genauigkeit des Bullenzuchtwerts von $r_{TI} = 0,8$ “ ganz auf die Nachkommenprüfung verzichtet werden. Im Ergebnis bleibt aber auch klar festzuhalten, dass für gewünschte Genauigkeiten von $r_{TI} \geq 0,8$ für niedrig erbliche Merkmale ($h^2 \leq 0,10$) und aktuell realistisch moderate Genauigkeiten der genomischen Zuchtwerte für diese niedrig erblichen Merkmale ($rMG = 0,5$) mindestens 57 Töchterleistungen pro Bulle einzuplanen sind.

Tab. 3 Erforderliche Anzahl Töchter für gewünschte Genauigkeiten (r_{TI}) des Bullenzuchtwerts bei Variation der Genauigkeit der genomischen Zuchtwertschätzung (rMG) und Erblichkeit (h^2) des Merkmals.

h^2	Genauigkeit des genomischen Zuchtwerts (rMG)							
	$rMG = 0,7$		$rMG = 0,7$		$rMG = 0,9$		nur Töchterinfo	
	$r_{TI} = 0,8$	$r_{TI} = 0,95$	$r_{TI} = 0,8$	$r_{TI} = 0,95$	$r_{TI} = 0,8$	$r_{TI} = 0,95$	$r_{TI} = 0,8$	$r_{TI} = 0,95$
0,01	581	3561	330	3310	0	1993	710	3694
0,05	115	705	65	656	0	395	141	732
0,10	57	348	32	324	0	195	70	361
0,15	38	230	21	213	0	129	46	238
0,20	28	170	16	158	0	95	34	176
0,25	22	134	13	125	0	75	27	139
0,30	18	111	11	103	0	62	22	115
0,35	16	94	9	87	0	53	19	97
0,40	13	81	8	75	0	45	16	84
0,45	12	71	7	66	0	40	15	74
0,50	11	63	6	59	0	35	13	65

Eine zweite Möglichkeit zur Erfassung von Gesundheitsmerkmalen neben den Testherdensystemen für Testbullentöchter ergibt sich im Rahmen einer zentralen Prüfung von Bullenmüttern auf Station. Hier ist zu evaluieren, ob ein substanzieller Informationsgewinn generiert werden kann, wenn von einer typisierten Bullenmutter, für die ein genomischer Zuchtwert vorliegt, noch zusätzlich phänotypische Leistungen zu niedrig erblichen Gesundheitsmerkmalen erfasst werden. Es wird deutlich (Abb. 3), dass die Genauigkeit in einem kombinierten Zuchtwert aus Eigenleistung und genomischen Zuchtwert (r_{TI}) niemals unter den Wert für die Genauigkeit des genomischen Zuchtwerts (rMG) fallen kann. Die Genauigkeit des genomischen Zuchtwerts ist somit als untere Grenze zu sehen. Insbesondere für die hier im Fokus stehenden niedrig erblichen Gesundheitsmerkmale bringt die gemessene Eigenleistung einer typisierten Bullenmutter nur marginalen Informationsgewinn. Genauigkeiten genomischer Zuchtwerte von $rMG = 0,6$ sollten auch für solche Merkmale mit niedrigen Heritabilitäten generell realisierbar sein (u. a. VAN RADEN et al 2009).

4. Fazit und Ausblick

Sowohl die eher traditionellen quantitativ genetischen Ansätze als auch die Verwendung genomischer Information ermöglichen es, erfolgreiche Zuchtstrategien auf Krankheitsresistenz beim Milchrind zu implementieren. Die zwei entscheidenden Grundvoraussetzungen sind

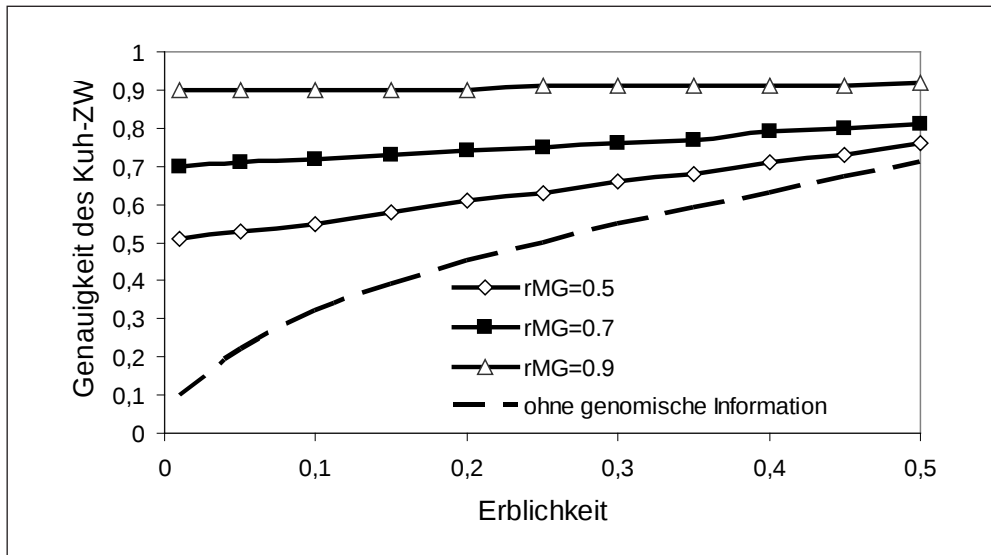


Abb. 3 Genauigkeit des Zuchtwerts einer Kuh (r_T) unter Berücksichtigung einer Eigenleistung und des eigenem Typisierungsergebnis für verschiedene Erblichkeiten und Korrelationen zwischen genomischem und wahren Zuchtwert (r_{MG}).

allerdings eine substanzielle Datenerfassung und die stringente Ausrichtung eines Zuchtprogramms, wirklich Gesundheitsmerkmale in den Mittelpunkt von Selektionsentscheidungen zu stellen. Eine in Zukunft rein genomische Selektionsstrategie ohne Töchterleistungen kann nur dann funktionieren, wenn die Genauigkeit des genomischen Zuchtwertes höher ist als die gewünschte Genauigkeit des Gesamtzuchtwertes. Allerdings ist hier der folgende praktische Aspekt zu bedenken: Insbesondere Gesundheitsmerkmale sind relativ neue Merkmale in der Tierzucht, und für diese muss erst ein substanzieller Pool phänotypischer Daten angelegt werden, mittels derer dann in einer Kalibrierungsgruppe SNP-Effekte abgeleitet werden können, welche in periodischen Zeitabständen auch aufgrund sich verändernder Kopplungsungleichgewichte immer wieder abgeglichen werden müssen (HABIER et al. 2007). Somit erscheint es sinnvoll, für beide Zwecke, nämlich die Generierung von zusätzlichen Töchterleistungen zur Absicherung genomischer Zuchtwerte von Bullen für niedrig erbliche Gesundheitsmerkmale, als auch für die Generierung wertvoller Daten zum Schätzen der SNP-Effekte, wie von SCHAEFFER (2006) und SWALVE und KÖNIG (2007) vorgeschlagen, die züchterische Kernarbeit in sogenannte Testherden zu verlagern.

Die Kombination von Phänotypen und genomischen Zuchtwerten für Selektionsentscheidungen wird in Zukunft mit hoher Wahrscheinlichkeit durch weitere neue Selektionsinstrumente aus dem Bereich der Molekulargenetik ergänzt. Hier sei insbesondere auf Genexpressionsstudien (u. a. BAUERSACHS et al. 2005) oder die Nutzung von Biomarkern (u. a. VAN DORLAND et al. 2009) verwiesen. Eine erste Studie zur Kombination von Ergebnissen der Genexpressionsanalyse mit SNP-Daten wurde kürzlich von PIMENTEL et al. (2011) durchgeführt. Deutliche SNP-Effekte für Fruchtbarkeitsmerkmale konnten in den für Genexpressionen relevanten Regionen des Genoms nachgewiesen werden. Kausale Pfade mit ihren Effekten vom Gen zum Phänotyp unter Berücksichtigung von Biomarkern wie Choleste-

rol wurden für verschiedene Krankheiten in der Humangenetik evaluiert (JANSSENS und VAN DUIJN 2008). Als innovative Weiterentwicklung gilt es nun zu überlegen, wie Strukturgleichungsmodelle mit Rückkoppelungseffekten in derartige Betrachtungen integriert werden können, um letztendlich unverzerrte Schätzwerte für eine Vielzahl an Selektionsinstrumenten für Zucht auf Krankheitsresistenz abzuleiten.

Literatur

- BARKEMA, H. W., GREEN, J. M., BRADLEY, A. J., and ZADOKS, R. N.: Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J. Dairy Sci.* 92, 4717–4729 (2009)
- BAUERSACHS, S., ULBRICH, S. E., GROOS, K., SCHMIDT, S. E. M., MEYER, H. D., EINSPIANIER, R., WENIGERKIND, H., VERMEHREN, M., BLUM, H., SINOWATZ, F., and WOLF, E.: Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrus cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. *J. Molec. Endocr.* 34, 889–908 (2005)
- BISHOP, S. C., CHESNAIS, J., and STEAR, M. J.: Breeding for disease resistance: issues and opportunities. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. CD-ROM communication 13-01 (2002)
- BUENGER, A., DUCROCQ, V., and SWALVE, H. H.: Analysis of survival in dairy cows with supplementary data on type scores and housing systems from a region of Northwest Germany. *J. Dairy Sci.* 84, 1531–1541 (2001)
- BUITENHUIS, A. J., LUND, M. S., THOMASEN, J. R., THOMSEN, B., NIELSEN, V., BENDIXEN, C., and GULDBRANDTSEN, B.: Detection of quantitative trait loci affecting lameness and leg conformation traits in Danish Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 90, 472–481 (2007)
- DEKKERS, J. C. M.: Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82, 313–328 (2004)
- DEKKERS, J. C. M.: Prediction of response to marker-assisted and genomic selection using selection index theory. *J. Anim. Breed. Genet.* 124, 331–341 (2006)
- FALCONER, D. S., and MACKAY, T. C. F.: Introduction to quantitative genetics. Harlow (UK): Longman 1996
- FIEDLER, A., LANDMANN, D., MAHLKOW-NERGE, K., MAIWORM, K., GRAMATTE, W., HEUTELBOCK, A., KEHLER, W., KÖNIG, S., PELZER, A., and WITTKOWSKI, G.: AID-Heft: Management der Klauengesundheit. (2008)
- GELDERMANN, H.: Investigations of quantitative characters in animals by gene markers. *Theor. Appl. Genet.* 46, 319–330 (1975)
- GIANOLA, D., and SORENSEN, D.: Quantitative genetic models for describing simultaneous and recursive relationships between phenotypes. *Genetics* 167/3, 1407–1424 (2004)
- GOFF, J. P., and HORST, R. L.: Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 1260–1268 (1997)
- GRÖHN, Y., SALONIEMI, H., and SYVÄJÄRVI, J.: An epidemiological and genetic study on registered diseases in Finnish Ayrshire cattle. *Acta Vet. Scand.* 27, 182–195 (1986)
- HABIER, D., FERNANDO, R. L., and DEKKERS, J. C. M.: The impact of genetic relationship information on genome-assisted breeding values. *Genetics* 177, 2389–2397 (2007)
- HAYES, B., and GODDARD, M. E.: The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. *Genet. Sel. Evol.* 33, 209–229 (2001)
- HERINGSTAD, B., KARLSEN, A., KLEMETSDAL, G., and RUANE, J.: Preliminary results from a genetic analysis of clinical mastitis data. *Interb. Bull.* 15, 45–49 (1997)
- HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., and RUANE, J.: Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livest. Prod. Sci.* 64, 95–106 (2000)
- HERINGSTAD, B., CHANG, Y. M., GIANOLA, D., and KLEMETSDAL, G.: Genetic analysis of clinical mastitis, milk fever, ketosis, and retained placenta in three lactations of Norwegian Red cows. *J. Dairy Sci.* 88, 3273–3281 (2005)
- HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., and STEINE, T.: Selection response for disease resistance in two selection experiments in Norwegian Red cows. *J. Dairy Sci.* 90, 2419–2426 (2007)
- HOLMBERG, M., and ANDERSSON-EKLUND, L.: Quantitative trait loci affecting health traits in Swedish dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87, 2653–2659 (2004)
- JANSSENS, A. C., and VAN DUIJN, C. M.: Genome-based prediction of common diseases: advances and prospects. *Hum. Molec. Genet.* 17, 166–173 (2008)
- KHATKAR, M. S., THOMPSON, P. C., TAMMEN, I., and RAADSMA, H. W.: Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet. Sel. Evol.* 36, 163–190 (2004)

- KÖNIG, S., und SWALVE, H. H.: Modellkalkulationen zu züchterischen Möglichkeiten auf Klauengesundheit beim Milchrind. *Züchtungskunde* 78, 345–356 (2006)
- KÖNIG, S., WU, X., GIANOLA, D., HERINGSTAD, B., and SIMIANER, H.: Exploration of relationships between claw disorders and milk yield in Holstein cows via recursive linear and threshold Models. *J. Dairy Sci.* 81, 395–406 (2008)
- KÖNIG, S., and SWALVE, H. H.: Application of selection index calculations to determine selection strategies in genomic breeding programs. *J. Dairy Sci.* 92, 5292–5303 (2009)
- LANDE, R., and THOMPSON, R.: The efficiency of marker assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *Genetics* 124, 743–753 (1990)
- LEFCOURT, A. M.: Influence of contractility of papillary sphincter muscle on penetrability of the papillary duct in the bovine quarter after machine milking. *Amer. J. Vet. Res.* 43, 573–575 (1982)
- LUND, M. S., SAHANA, G., ANDERSSON-EKLUND, L., HASTINGS, N., FERNANDEZ, A., SCHULMANN, N., THOMSEN, B., VIITALA, S., WILLIAMS, J. L., SABRY, A., VILNALASS, H., and VILKKI, J.: Joint analysis of quantitative trait loci for clinical mastitis and somatic cell score on five chromosomes in three Nordic dairy cattle breeds. *J. Dairy Sci.* 90, 5282–5290 (2007)
- MEUWISSEN, T. H. E., HAYES, B., and GODDARD, M. E.: Prediction of total genetic value using genome wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819–1829 (2001)
- PIMENTEL, E. C. G., BAUERSACHS, S., TIETZE, M., SIMIANER, H., TETENS, J., THALLER, G., REINHARDT, F., WOLF, E., and KÖNIG, S.: Exploration of relationships between production and fertility traits in dairy cattle via association studies of SNPs within candidate genes derived by expression profiling. *Anim. Genet.* 42/3, 251–262 (2011)
- REKSEN, O., SOLVEROD, A., BRANSCUM, J., and ØSTERAS, O.: Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89, 2928–2937 (2006)
- RUPP, R., and BOICHARD, D.: Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.* 34, 671–688 (2003)
- SATO, K., BARTLETT, P. C., ALBAN, L., AGGER, J. F., and HOUE, H.: Managerial and environmental determinants of clinical mastitis in Danish dairy herds. *Acta. Vet. Scand.* 50, 4 (2008)
- SCHAEFFER, L. R.: Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genetics* 123, 218–223 (2006)
- SIMIANER, H., SOLBU, H., and SCHAEFFER, L. R.: Estimated genetic correlations between disease and yield traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74, 4359–4365 (1991)
- SIMIANER, H., und KÖNIG, S.: Ist Zucht auf Krankheitsresistenz möglich? *Züchtungskunde* 74, 413–425 (2002)
- SWALVE, H. H., and KÖNIG, S.: Test herds in dairy cattle breeding programmes: 1st communication: General considerations. *Züchtungskunde* 79, 449–262 (2007)
- VAN DORLAND, H. A., RICHTER, S., MOREL, I., DOHERR, M. G., CASTRO, N., and BRUCKMEIER, R.: Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 1924–1940 (2009)
- VAN RADEN, P. M., VAN TASSEL, C. P., WIGGANS, G. R., SONSTEGARD, T. S., SCHNABEL, R. D., TAYLOR, J. F., and SCHENKEL, F. S.: Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 92, 16–24 (2009)
- WIMMERS, K.: Defektgene beim Schwein: Stand der molekulargenetischen Charakterisierung und Perspektiven. *Züchtungskunde* 80, 35–42 (2007)

Prof. Dr. Sven KÖNIG
Universität Kassel
Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften
(FB 11)
Fachgebiet Tierzucht
Nordbahnhofstraße 1a
37213 Witzenhausen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 5542 981677
Fax: +49 5542 981589
E-Mail: sven.koenig@uni-kassel.de

Otto Schlüter (1872–1959)

Sein Wirken für die Geographie und die Leopoldina

Leopoldina-Meeting am 16. und 17. Oktober 2009 in Halle (Saale)

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 112, Nr. 383

Herausgegeben von Walter ROUBITSCHKE (Halle/Saale) und Günther SCHÖNFELDER (Leipzig)

(2011, 295 Seiten, 32 Abbildungen, 3 Tabellen, 24,95 Euro, ISBN: 978-3-8047-2807-3)

Der Geograph Otto SCHLÜTER (1872–1959) hat sich als Forscher und XXI. Präsident der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina bleibende Verdienste um die Förderung der Wissenschaften in Deutschland erworben. Seine Beiträge zur theoretisch-methodischen Fundierung der Anthropogeographie wie sein lebenslanges Mühen um Aufklärung der Genese der Kulturlandschaft Mitteleuropas, das ungezählte Regionalstudien anregte, zählen zu den Marksteinen der deutschen Geographie. Zugleich förderte SCHLÜTER maßgeblich die Forschungen zur Landeskunde im mitteldeutschen Raum. An der Universität in Halle (Saale) prägte er von 1911 bis 1951 die geographische Lehre. Der Band analysiert SCHLÜTERS Plädoyer für eine „Geographie des Menschen“ sowie seine Bedeutung in Siedlungsgeographie, Kulturlandschaftsforschung und Landeskunde (*Mitteldeutscher Heimat-atlas*). Ausführlich wird außerdem seine langjährige Tätigkeit als Hochschullehrer und sein Wirken als verantwortlicher Vizepräsident (1945–1952) bzw. Präsident (1952–1953) der Leopoldina, deren Unabhängigkeit gegenüber dem DDR-Staat er zu wahren wusste, gewürdigt. Ein Bericht zu einer Exkursion auf SCHLÜTERS Spuren sowie mehrere Anhänge (u. a. ein Publikationsverzeichnis, Mitarbeiter- und Doktorandenlisten) ergänzen den Tagungsband aus Anlass des 50. Todestages des Geehrten.

Zuchtprogramme für quantitative Merkmale auf der Basis molekulargenetischer Analysen

Hermann H. SWALVE (Halle/Saale)

Mit 5 Abbildungen

Zusammenfassung

Die Technologie hochdichter SNP-Arrays (SNP = *single nucleotide polymorphism*) bietet die Möglichkeit, populationsweites Kopplungsungleichgewicht zu nutzen, und hat ihre Möglichkeiten für die züchterische Selektion von Nutztieren und insbesondere Milchrindern bereits unter Beweis gestellt. Dieses Zuchtverfahren wird Genomische Selektion genannt und wird dadurch initiiert, dass Phänotypinformation dem SNP Genotyp-Status in einer Kalibrierungsstichprobe gegenübergestellt wird, so dass SNP-Effekte geschätzt werden können. Die geschätzten SNP-Effekte können dann zur Schätzung von Zuchtwerten für junge Selektionskandidaten genutzt werden, die keinerlei Phänotypinformation aufweisen. In der Milchrinderzucht können die Tiere in der Lernstichprobe entweder Bullen mit sicher aus der Nachkommenprüfung geschätzten Zuchtwerten oder Kühe mit individuellen Phänotypwerten sein. Die Sicherheit der sogenannten genomischen Zuchtwerte wird aus der Lernstichprobe abgeleitet, wobei die Größe der Lernstichprobe ein entscheidender Faktor für hohe Sicherheiten ist. Die Sicherheit der genomischen Zuchtwertschätzung wiederum ist ein entscheidender Faktor für Entscheidungen hinsichtlich der Implementierung eines ‚genomischen‘ Zuchtprogramms. Bei hohen Sicherheiten (> 70 %) sollten Jungbullen in der Population in einen breiten Einsatz gehen. Die Notwendigkeit, neue Merkmale in Zuchtziele aufzunehmen, wird es erforderlich machen, dass spezielle Vertragsherden die Aufgabe übernehmen, die entsprechenden Phänotypinformationen zu liefern.

Abstract

The technology of high-density SNP-arrays (SNP = Single nucleotide polymorphism) offers the opportunity to capitalize on population wide linkage disequilibrium and has already proven its capabilities for the genetic selection of livestock and especially dairy cattle. This method of selection is called genomic selection and is initiated by matching phenotype information with SNP genotype status in a training data set from which SNP effects are estimated. Estimates of the SNP effects then can be used to predict breeding values of young candidates for selection that have no phenotypic information. In dairy cattle, animals in the training data set can be sires with reliable phenotypic information, i.e. breeding values conventionally estimated from progeny records; and/or cows with individual phenotypic records. The reliability of the so called genomic breeding values is derived from the training data set. It has been found that increasing the size of the training data set is an important factor to obtain high reliabilities. The reliabilities of genomic breeding values in turn are a crucial factor for decisions on how to implement a ‘genomic’ breeding programme. With high reliabilities (> 70 %), young bulls with genomic breeding values should be given into widespread use for the entire population. New traits arising from the need to define new breeding goals will require the set-up of specific contract herds to deliver future phenotypic information.

1. Einleitung

Die züchterische Bearbeitung quantitativer Merkmale beim Milchrind hat sich von der reinen Selektion nach Phänotyp im 20. Jahrhundert bis zur Selektion nach geschätzten additiv-gene-

tischen Werten (Zuchtwerten) entwickelt. Zur Schätzung des Zuchtwertes wurden bislang Verfahren basierend auf der BLUP-Methode (HENDERSON 1973) verwendet, welche in der Lage sind, verzerrende Umwelteinflüsse und additiv-genetische Einflüsse optimal zu trennen. Dabei werden im sogenannten Tiermodell alle verwandtschaftlichen Beziehungen der Individuen betrachtet. Eine Hinzuziehung von direkten Informationen zum Genotyp des Tieres in seiner Gesamtheit bzw. zum Genotyp am individuellen Locus gab es bis zur Entwicklung der Marker gestützten Selektion jedoch nicht. Als Marker können grundsätzlich alle Abschnitte eines DNA-Stranges bzw. auch punktuelle Informationen, also Informationen zu einzelnen Basen in ihrer Abfolge auf der DNA, dienen, soweit sie labordiagnostisch eindeutig bestimmbar und innerhalb der betrachteten Population polymorph sind. Insbesondere mit den in großer Zahl beschriebenen Mikrosatelliten ergab sich die Möglichkeit, sie als Marker auf der DNA zu nutzen, obschon Mikrosatelliten selbst nicht-kodierende, repetitive Sequenzen kurzer Basenfolgen darstellen. Das zugrundeliegende Denkmodell dabei ist das Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichtes zwischen Marker und kausal auf den Phänotyp wirkenden Genen (LANDE und THOMPSON 1990). Wichtigste Ursache für das Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichtes ist die Kopplung von Marker und kausalem Gen aufgrund räumlicher Nähe auf der DNA. Prinzipiell lassen sich mit diesem Ansatz sowohl Gene identifizieren, welche einen messbaren Einfluss auf ein quantitatives Merkmal haben (sogenannte QTL = *quantitative trait loci*, nach GELDERMANN 1975), als auch Selektionsverfahren implementieren (Marker gestützte Selektion).

Die Nutzung von Markern ist umso effektiver, je mehr Marker je Chromosom zur Verfügung stehen. Abgesehen von Markern, welche direkt eine Punktmutation mit kausaler Wirkung auf den Phänotyp darstellen, zieht das Konzept der Nutzung von Markern und insbesondere der Nutzung von Mikrosatelliten gleichzeitig nach sich, dass die Kopplungsphase zwischen QTL und Marker in der Abfolge der Generationen immer wieder geprüft werden muss. Dies verursacht hohe Kosten bei der Genotypisierung, wobei die Kosten aus heutiger Sicht weniger in der eigentlichen Genotypisierung im Labor zu sehen sind, als vielmehr in der Logistik der Probengewinnung, des Probentransportes und der DNA-Extraktion liegen. Diese Kostenbelastung lässt sich innerhalb der Nutztierspezies am ehesten beim Rind tragen, da hier das Einzeltier wertvoll, die Vermehrungsrate gering und das Generationsintervall besonders lang ist. Durch die beim Milchrind übliche künstliche Besamung kommt ein extrem hoher Multiplikationsfaktor für das männliche Tier hinzu, welcher einerseits dieses Tier noch wertvoller macht und andererseits auch noch mehr unterstreicht, dass der Zuchtwert möglichst genau geschätzt werden sollte.

Molekulare Typisierungen bei Nutztieren haben ganz grundsätzlich die Eigenschaft, dass sie vorgenommen werden können, sobald das Individuum existiert. Diese Eigenschaft lässt sich bei der züchterischen Verbesserung qualitativer wie quantitativer Merkmale nutzen. Für quantitative Merkmale lassen sich direkte Informationen über den Genotyp darüber hinaus als Steigerungsfaktor für die Sicherheit der Zuchtwertschätzung interpretieren. Dies kann auch völlig graduell, wenn auch nicht unbedingt linear, betrachtet werden: Wenn wenig molekulare Information zu den herkömmlichen Informationsquellen der Zuchtwertschätzung (Phänotypinformationen) hinzugefügt wird, so ergibt sich immer noch eine geringe Steigerung der Genauigkeit der Zuchtwertschätzung. Andererseits wäre eine perfekte Kenntnis aller Gen- und Allelwirkungen bei einem betrachteten Individuum hinsichtlich der Zuchtwertschätzung als 100%ige Genauigkeit zu interpretieren.

Die genannten grundsätzlichen Eigenschaften molekularer Information hinsichtlich ihrer Nutzung in der Zucht gelten bei allen Nutztierarten. Wie aber schon ausgeführt, ist die prak-

tische Implementierung geeigneter Zuchtverfahren auch eine Frage der Kosten. Die Vorreiterstellung der Milchrinderzucht ist also offenkundig. Technologiesprünge werden es aber ermöglichen, die Kosten der Umsetzung molekulargenetischer Verfahren für die Zucht immer weiter zu senken, und damit wird die sogenannte molekulare Tierzucht auch bei anderen Nutztierarten als dem Milchrind immer interessanter. So würden sich beispielsweise beim Schwein besonders vorteilhafte Ansätze ergeben, die durch die Dominanz der Kreuzungszucht denkbar wären. Ein anderes Beispiel ist das Fleischrind, welches weltweit üblicherweise in einer Art Ranchhaltung gehalten wird; diese Art der Haltung steht der Einführung der künstlichen Besamung auch heute noch im Wege. Gerade auch unter den Bedingungen des Natursprungs sind molekulare Ansätze zur Zucht prinzipiell möglich, sie wären allerdings nur zu hohen Kosten auch implementierbar.

Derzeit liegen bereits zahlreiche Ergebnisse zur Nutzung molekularer Information in der Rinderzucht vor und sollen deshalb im Folgenden ausschließlich betrachtet werden.

2. Marker-gestützte Selektion und Genomische Selektion

Die Marker-gestützte Selektion auf der Basis von Mikrosatelliten zur Nutzung von QTL-Effekten war beim Milchrind in den Jahren 1990 bis 2010 das wesentliche Verfahren zur Nutzung molekularer Information bei der züchterischen Verbesserung quantitativer Merkmale. DEKKERS und HOSPITAL (2002) stellen in einem Übersichtsreferat zunächst allerdings fest, dass außer für den seltenen Fall, in dem sich mit Markern ein überwiegender Teil der genetischen Variation für ein quantitatives Merkmal beschreiben lässt, die Selektion weiter auf einer Kombination von molekularer und phänotypischer Information beruhen wird. Beim Milchrind sind grundsätzlich zwei Wege zum Einbau von Markerinformation in Selektionsentscheidungen begangen worden: Einerseits die Nutzung von Markern bei der Vorselektion von Jungbullen, die noch einen Testeinsatz zur Erzeugung von Nachkommen, und damit zur Gewinnung von Phänotypinformation, absolvieren sollen (MACKINNON und GEORGES 1998) und andererseits der direkte Einbau der Markerinformation in die Zuchtwertschätzung nach der Hendersonschen BLUP-Methode (FERNANDO und GROSSMAN 1989). Ein regelrechter Durchbruch derartiger Zuchtmethoden wurde in der Milchrinderzucht in den genannten Jahren aber nicht erzielt. Die Gründe hierfür waren vornehmlich die kostenaufwändige Genotypisierung aller in einem Milchrinderzuchtprogramm wichtigen Zuchttiere (Bullen, Bullenmütter) zur ständigen Überprüfung der Kopplungsphase zwischen Marker und QTL sowie vornehmlich auch die Tatsache, dass nur sehr wenige QTL mit größeren Effekten überhaupt gefunden werden konnten. Für die Vorselektion von Jungbullen kam hinzu, dass diese voraussetzt, dass überhaupt eine Wahlmöglichkeit für das Ergebnis einer Anpaarung von Bullenvater und Bullenmutter besteht, d. h. dass mehrere Bullenkälber mit Hilfe von Reproduktionstechnologien (insbesondere Embryo-Transfer) erzeugt wurden. Dies war jedoch meist nicht der Fall. Die Marker-gestützte Selektion auf der Basis von Mikrosatelliten blieb damit nur eine begrenzt nutzbare Technologie.

MEUWISSEN et al. (2001) beschrieben in ihrer bahnbrechenden Simulationsstudie, dass die effektive Nutzung von populationsweitem Kopplungsungleichgewicht allerdings dann für die Tierzucht möglich wird, wenn Genotypisierungen für Punktmutationen über das ganze Genom eines Individuums mit hoher Dichte vorgenommen werden können. Diese Form der Genotypisierung bieten SNP-Arrays (SNP = *single nucleotide polymorphism*). Auch DEK-

KERS und HOSPITAL (2002) halten als Schlussfolgerung fest, dass erst diese Form der Genotypisierung der Nutzung von molekularer Information bei quantitativen Merkmalen zum endgültigen Durchbruch verhelfen wird.

SNP sind Punktmutationen (Basenaustausche) auf der DNA und sind im Genom, auch in schon länger intensiv züchterisch bearbeiteten Rassen, relativ häufig. Das Genom des Rindes umfasst ca. 3,3 Mrd. Basenpaare, davon sind ca. 4,6 Mio. auch polymorph und mithin als SNP anzusehen (*The Bovine HapMap Consortium* 2009). Mit der Hilfe von hochdichten SNP-Arrays können derzeit 50 000 SNP und in naher Zukunft wohl noch wesentlich größere Anzahlen (z. B. 800 000 SNP) je Tier in einem Schritt bestimmt werden. Die Typisierungskosten je Genotyp sind damit extrem niedrig und steigen mit der Weiterentwicklung dichter Chips nicht linear, sondern nur degressiv. Durch die gleichmäßige Verteilung der SNP über das Genom lässt sich vorhandenes Kopplungsungleichgewicht weitgehend nutzen. Der prinzipielle Weg für die Implementierung einer auf dieser Technologie basierenden Selektionsmethode lässt sich in folgenden Schritten darstellen:

- (1.) Schätzung der SNP-Effekte in einer Lernstichprobe auf der Basis von SNP-Typisierungen und „sicheren“ Phänotypinformationen;
- (2.) Verifikation der gefundenen Güte der Schätzung in einer Validierungsstichprobe;
- (3.) Verwendung der SNP-Schätzer zur Schätzung von („genomischen“) Zuchtwerten bei Tieren ohne Phänotypinformation;
- (4.) kontinuierliche Neuschätzung der SNP-Effekte und Ausweitung bzw. Neudefinition der Lernstichprobe;
- (5.) „harte“ Validierung der genomischen Zuchtwerte bei Tieren, die rein aufgrund genomischer Zuchtwerte selektiert wurden, zu einem späteren Zeitpunkt unter Hinzunahme von Phänotypinformation.

Auf die Methoden zur Schätzung der SNP-Effekte soll hier nicht eingegangen werden. Ebenso sei nur erwähnt, dass Schritt 1 und 3 sich auch in einem einzigen Schritt kombinieren lassen, wenn die Allelinformation zu den SNP ausschließlich als Grundlage zur Ableitung einer genomischen Verwandtschaftsmatrix eingesetzt wird, welche dann in einem BLUP-Modell Verwendung findet (*One-Step-Methode*); SNP-Effekte selbst werden dann aber nicht mehr geschätzt bzw. müssen als Rücklösung ermittelt werden (AGUILAR et al. 2010).

Schritt (1.) beinhaltet zunächst eine Auswahl von Tieren, welche die Lern- bzw. Kalibrierungsstichprobe darstellen. In der Milchrinderzucht ist es günstig, wenn hierzu Bullen herangezogen werden, welche sehr sichere Zuchtwerte (Sicherheit der Zuchtwertschätzung > 90%) aufgrund von Phänotypinformationen (Nachkommen) aufweisen. Dies sollte auch für Merkmale gelten, welche nicht unbedingt sofort zum Zeitpunkt erster Einsatzleistungen von Töchtern schon vollständig erhoben sind (z. B. Langlebigkeit). Derartige Bullen werden deshalb Bullen schon zurückliegender Geburtsjahre sein, also gegenüber dem aktuellen Jahr mindestens fünf bis sechs Jahre früher geboren sein. Wenn dann die Lernstichprobe nicht nur einen einzelnen Jahrgang umfassen soll, so ergibt sich als Lernstichprobe ein Zeitraum für die Bullengeburtsjahrgänge von mindestens sechs bis 12 oder 15 Jahren vor dem aktuellen Jahr. Manche Versuchsansteller weiten diesen Zeitraum auch noch aus, um die Lernstichprobe noch zu vergrößern. Dies muss zwar im Hinblick darauf, dass dann mehrere Generationen bezogen auf das aktuelle Jahr vergangen sind und so die Gefahr besteht, dass sich vorhandenes Kopplungsungleichgewicht doch schon langsam abbaut, als negativ beurteilt werden. Hinsichtlich der möglichst vollständigen Erfassung von Verwandtschaftsverhältnissen, die

gerade beim Milchrind durch den sehr starken Einfluss bestimmter Bullenlinien gekennzeichnet sind, ist dieses Vorgehen jedoch positiv zu werten.

Eine erste Validierung, die es aber nur beim Übergang von der reinen Nachkommenprüfung zur Genomischen Selektion gibt, findet in Schritt (2.) durch die Einbeziehung der Bullenjahrgänge, welche relativ zum aktuellen Jahr vier bis fünf Jahre früher geboren werden und die somit erste Zuchtwerte aufgrund von Nachkommeninformation aufweisen, durch den Vergleich genomischer Zuchtwerte mit den herkömmlich geschätzten Zuchtwerten statt. Diese Bullen sind als Jungtiere aber noch basierend auf den herkömmlich geschätzten Zuchtwerten der Eltern vorausgewählt worden, weshalb sie nicht als Bullen zur „harten“ Validierung angesehen werden können.

Im Schritt (3.) werden die zur Wahl stehenden Kandidaten, also z. B. Bullenkälber zur Aufnahme in die Besamungsstation als potentielle Besamungsbullen, direkt auf der Basis ihrer genomischen Zuchtwerte selektiert. Die Kernfrage, die sich jetzt stellt, ist, ob sie einen Testeinsatz zur Erzeugung von Nachkommen zur Gewinnung von Phänotypinformation durchlaufen sollten, oder ob sie ohne eine weitere Prüfung auf der Basis ihrer genomischen Zuchtwerte in einen breiten Besamungseinsatz gehen können. Die Beantwortung dieser Frage ist zentral abhängig von der Höhe der Sicherheit der genomischen Zuchtwertschätzung, bzw. konkreter von der quadrierten Korrelation zwischen genomisch geschätztem und wahren Zuchtwert (r^2_{MG}). Diese Größe ist nicht direkt beobachtbar, sondern muss unter genetisch-statistischen Annahmen an der Lernstichprobe abgeleitet werden. Häufig wird in der Literatur deshalb auch lediglich die Korrelation (oder quadrierte Korrelation) zwischen genomisch und herkömmlich geschätzten Zuchtwerten in der Lernstichprobe oder der Validierungsstichprobe angegeben, so dass insgesamt leider eine Fülle von ähnlich erscheinenden Parametern existiert. Auf der Basis der Arbeiten von LANDE und THOMPSON (1990) haben sich insbesondere DAETWYLER et al. (2008) und GODDARD (2008) mit der Ableitung von erwarteten Werten für r_{MG} befasst.

Mittlerweile ist das in den oben genannten Schritten grundsätzlich erläuterte System schon mehrfach in die Praxis überführt worden. Die Publikationen hierzu beschreiben entweder das in einem bestimmten Land verwendete Verfahren und als Resultat die erzielte Sicherheit der genomischen Zuchtwertschätzung oder widmen sich auch den zahlreichen methodischen Aspekten auf dem Weg dorthin. Die Gruppierung der Projekte nach Ländern ergibt sich daraus, dass jeweils versucht wurde, eine möglichst große Lernstichprobe zusammenzustellen. Dies zog sogar die Gründung von Konsortien zur Genomischen Selektion über Ländergrenzen hinweg nach sich. Als erstes Übersichtsreferat aus dem Jahre 2009, welches versucht, die verschiedenen Projekte zu erörtern, findet sich die Arbeit von HAYES et al. (2009a). Als Beispiele seien die Publikationen von HARRIS et al. (2008) und HARRIS und JOHNSON (2010) für Neuseeland, VANRADEN et al. (2009) für USA/Kanada, MOSER et al. (2009) für Australien, BERRY et al. (2009) für Irland, SU et al. (2010) für Dänemark, DE ROOS (2009) für die Niederlande, DUCROCQ et al. (2009) für Frankreich und LIU et al. (2009) sowie HABIER et al. (2010) für Deutschland, genannt. Schon von VANRADEN et al. (2009) wird die Abhängigkeit der Größe von r_{MG} von der Größe der Lernstichprobe besonders herausgestellt, und es wird aufgerufen, durch Kooperationen neue, immer größere Lernstichproben zusammenzustellen. Dies führte in Europa zu Gründung des Konsortiums Eurogenomics für die gemeinsame Analyse einer sehr großen Lernstichprobe (DHV 2010), welche für die Rasse Holstein über 17 000 Bullen mit „sicheren“ Zuchtwerten aus den Ländern Deutschland, Frankreich, Niederlande und Dänemark/Schweden (in diesen beiden Ländern wurde die Zuchtwertschätzung für Milchrinder auch schon vor der Genomischen Selektion gemeinsam durchgeführt) umfasst.

Die Ergebnisse der genannten Projekte können an dieser Stelle nicht im Detail diskutiert werden; insgesamt wurden variierend in Abhängigkeit der Größe der Lernstichprobe, des Berechnungsganges für r_{MG} und dem jeweils betrachteten Merkmal Sicherheiten der genomischen Zuchtwertschätzung in Höhe von 0,50 bis 0,80 erzielt. Für die nachfolgende Betrachtung der Implementierung der Genomischen Selektion in Zuchtprogramme für Milchrinder ist die Sicherheit der Genomischen Selektion zwar von zentraler Bedeutung, in einer Angabe als Bandbreite für r_{MG} allerdings zunächst ausreichend.

Gewissermaßen als Nebenprodukt des gesamten Ablaufes der Genomischen Selektion fallen im Schritt (I.) auch Schätzwerte für SNP-Effekte an, welche, wie in der heutigen Literatur zu genomischen Assoziationsstudien üblich, als sogenannte Manhattan-Plots übersichtsmäßig dargestellt werden können. Vollständig für alle relevanten Merkmale der Milchrinderzucht werden derartige Grafiken in ständig erneuerter Form mit dem Anwachsen der Lernstichprobe beispielsweise durch das *Animal Improvement Programs Laboratory*, AIPL, des US-Agrarministeriums USDA im Internet publiziert (AIPL 2009). Legt man diesen „grafischen Überblick in schneller Form“ zu Grunde, so erkennt man, dass bei nahezu allen Merkmalen jeweils nur sehr wenige QTL mit großer Wirkung erkannt werden können. Dies zeigt, dass das infinitesimale Modell, welches die Tierzucht durch das 20. Jahrhundert hindurch begleitet hat, in hohem Maße an die tatsächliche Situation angepasst war und ist. Das Vorhandensein nur weniger QTL mit sehr großer Wirkung unterstreicht auch, weshalb die Marker gestützte Selektion auf der Basis ausgewählter Mikrosatelliten nur begrenzt erfolgreich war, und betont aber andererseits, weshalb die Genomische Selektion auf der Basis hochdichter SNP-Arrays so erfolgversprechend ist. In der Genomischen Selektion wird durch die jeweilige Berechnung des genomischen Zuchtwertes als Summe aller SNP-Effekte explizit berücksichtigt, dass sich der additiv-genetische Wert eines Individuums aus einer Vielzahl sehr kleiner Effekte zusammensetzt.

Insgesamt kann das Grundmodell der Tierzucht in seiner Wandlung über die vergangenen 20 Jahre wie folgt dargestellt werden, wobei Wechselwirkungen zwischen Genotyp und Umwelt hier vernachlässigt werden:

- Modell 1: $P = G + U$
- Modell 2: $P = \sum QTL + PG + U$
- Modell 3: $P = \sum SNP (+ PG) + U$

wobei P den Phänotyp, G den Genotyp, U die Umweltwirkungen und QTL und SNP jeweils die Effekte der QTL und SNP darstellen und PG den „verbleibenden“ polygenen Rest bezeichnet, welcher im Modell 3 unter Umständen völlig entbehrlich ist, da die SNP-Arrays eine sehr enge Abdeckung des Genoms aufweisen.

3. Implementierung der Genomischen Selektion

In der ersten publizierten Zuchtplanungsrechnung zur Implementierung der Genomischen Selektion beim Milchrind unter Einbeziehung der Kosten zeigte SCHAEFFER (2006), dass ein Zuchtprogramm, welches die Genomische Selektion konsequent verwendet, nicht nur einem herkömmlichen Besamungszuchtprogramm ebenbürtig ist, sondern im Zuchtfortschritt dieses sogar um 100 % übertrifft. Die Konsequenz liegt dabei darin, dass die Jungbullen, welche als Kandidaten rein genomisch selektiert werden, sofort unbegrenzt in der Population eingesetzt werden. Der Ablauf ist in Abbildung 1 (nach SWALVE und KÖNIG 2007) dargestellt.

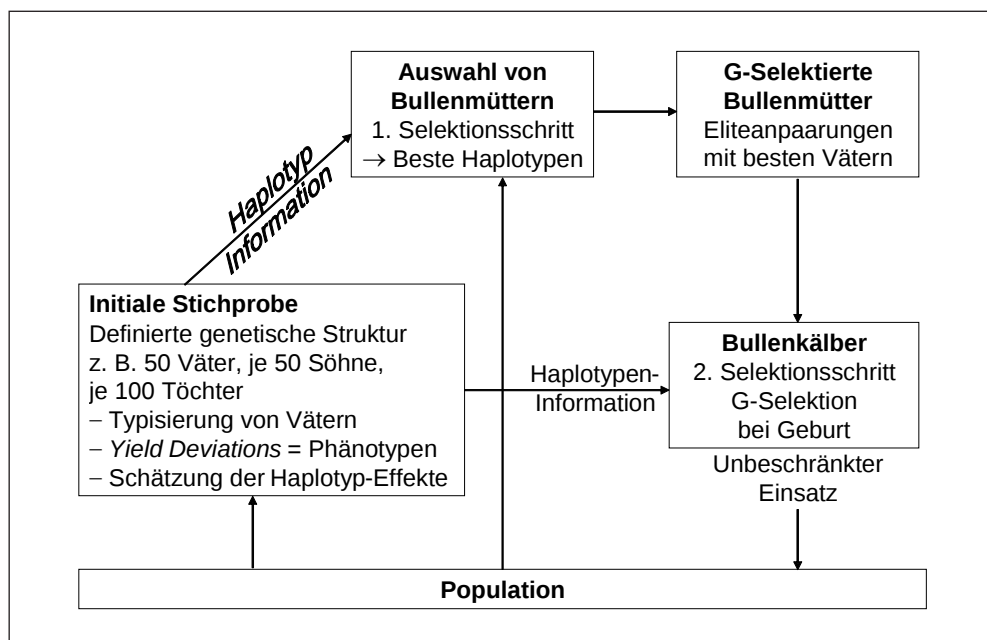


Abb. 1 Schema des Zuchtprogramms von SCHAEFFER (2006) für die Genomische Selektion beim Milchrind (nach SWALVE und KÖNIG 2007)

Die initiale Stichprobe umfasst bei SCHAEFFER (2006) insgesamt 2500 Bullen, die sich auf 50 Bullenväter à 50 Söhne verteilen. Die Schätzung der SNP-Effekte erfolgt nach SCHAEFFER als Schätzung der Haplotypeffekte benachbarter SNP. Sowohl Bullenmütter als auch alle aus den Eliteanpaarungen anfallenden Bullenkälber werden typisiert. Die Genauigkeit der genomischen Zuchtwerte wird bei SCHAEFFER mit 0,75 angenommen, was quadriert einer Sicherheit von lediglich 0,56 entspricht. Damit befindet sich SCHAEFFER aus heutiger Sicht am unteren Ende der oben genannten Bandbreite. Auch seine zur damaligen Zeit gemachte Annahme, jede SNP-Typisierung würde Kosten in Höhe von 500 kanadischen Dollar verursachen, ist aus heutiger Sicht überholt, da die Kosten mittlerweile stark gesunken sind. Trotz dieser Annahme errechnet SCHAEFFER in seiner Modellkalkulation, dass auch die Kosten eines derartigen Zuchtprogramms durch den Wegfall der Wartebullenhaltung lediglich mit rund einem Zehntel der Kosten des herkömmlichen Zuchtprogrammes anzusetzen sind. Mithin ist die seither in der weltweiten Zuchtpraxis beim Milchrind vorhandene Aufregung verständlich, denn doppelter Zuchtfortschritt bei einem Zehntel der Kosten sind sehr starke Argumente für eine völlige Abkehr vom bisherigen Besamungszuchtprogramm basierend auf der Nachkommenprüfung. Für die tatsächliche Umsetzung in die Praxis muss allerdings beachtet werden, dass eine Sicherheit der Zuchtwertschätzung in der Größe von 56 % wohl kaum eine Akzeptanz in der Züchterschaft bzw. auch bei Abnehmern kommerzieller Milchproduktionsbetriebe hätte. Zuchtplanungsrechnungen, welche nur den genetischen Fortschritt als Zielparаметer haben, können zu Ergebnissen führen, welche trotz deutlicher Überlegenheit für ein bestimmtes Zuchtprogramm zu keiner praktischen Implementierung führen, wenn die Züchtung, wie beim Milchrind üblich, die gesamte Population nicht auch vollständig kontrolliert. Auch vor

der Genomischen Selektion gab es Vorschläge für hinsichtlich des genetischen Fortschritts überlegene Zuchtprogramme, welche aufgrund mangelnder Akzeptanz trotzdem scheiterten. Als Beispiele seien beim Milchrind geschlossene Nukleuszuchtprogramme mit Geschwisterprüfung für Bullen oder sogenannte Jungbullen-Zuchtprogramme mit hohem Anteil an Besamungen durch Jungbullen genannt.

Trotz dieser Zusammenhänge kann die Publikation von SCHAEFFER als „Landmark-Paper“ bezeichnet werden, da sie grundsätzlich das hohe Potential der Genomischen Selektion beim Milchrind aufzeigt. Als Konsequenz aus der erörterten Problematik ergeben sich für die Implementierung der Genomischen Selektion drei Kernfragen, die nachfolgend behandelt werden sollen.

3.1 Die Größe der Lernstichprobe als entscheidender Faktor

Wie schon oben ausgeführt, zeigen die Ergebnisse von VANRADEN et al. (2009), dass durch die Erhöhung der Größe der Lernstichprobe die Sicherheit der genomischen Zuchtwerte entscheidend gesteigert werden kann. Dem gegenüber zeigt dieselbe Arbeit, wie beispielsweise auch die Arbeit von WEIGEL et al. (2009), dass die Anzahl der SNP je SNP-Array zwar mit steigender Größe des Arrays eine höhere Sicherheit nach sich zieht, dieser Effekt jedoch vergleichsweise klein ist, wenn erst ein gewisses Minimum von ca. 4000 bis 10000 SNP überschritten wurde. SNP-Arrays mit sehr hohen Dichten, wie sie zukünftig zur Anwendung kommen werden, sind mithin für die Genomische Selektion zwar förderlich, aber nicht essentiell, während derartige Chips für die Aufdeckung von QTL-Effekten eine deutlich größere Bedeutung haben. Als Schlussfolgerung verbleibt also, dass zunächst die Größe der Lernstichprobe, wenn es irgendwie möglich ist, an das Optimum herangeführt werden sollte. Was ist nun das Optimum? Diese Frage ist verwandt mit der Frage nach einer ausreichenden Größe der Stichprobe für Studien der genomweiten Assoziierung. VISSCHER (2008) führt aus, dass zur Aufdeckung von Effekten in der Größenordnung von ca. 0,2 % der Totalvarianz eine Stichprobengröße von ca. 40000 Individuen nötig ist. GODDARD (2008) sowie HAYES et al. (2009b) zeigen, dass genau diese Größenordnung auch erforderlich ist, wenn Phänotypwerte einzelner Individuen für die Lernstichprobe in der Genomischen Selektion herangezogen werden sollen und bei Heritabilitäten von ca. 0,20 bis 0,30 Sicherheiten der genomischen Zuchtwertschätzung von ca. 60 bis 70 % gefordert werden. Durch „sichere“ Phänotypwerte, wie sie durch „sichere“ Bullenzuchtwerte bereitgestellt werden können, sinkt diese Zahl der nötigen Individuen auf 5000 bis 10000. Die Abbildungen 2 und 3 erläutern diese Zusammenhänge für Bullenzuchtwerte (Abb. 2) und Individualphänotypen (Abb. 3).

Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, erfüllt die oben erwähnte Lernstichprobe des Eurogenomics-Konsortiums mit einer Größe von 17000 Bullen die theoretischen Anforderungen vollständig, da die Sicherheit durch eine noch größere Stichprobe gar nicht wesentlich weiter gesteigert werden könnte. Gleichzeitig zeigt Abbildung 2 aber auch, dass kleine Populationen bzw. Rassen der internationalen Milchrinderzucht große Probleme haben, überhaupt eine taugliche Lernstichprobe zusammenzustellen. Wenn beispielsweise nur wenige Hundert Bullen bislang jährlich nachkommegeprüft wurden, ist es schwer bzw. fast unmöglich, eine Lernstichprobe von ca. 5000 Bullen oder zumindest 3000 Bullen überhaupt zusammenzuführen.

Eine Alternative bietet sich in diesem Fall über die Typisierung von Kühen zur Bildung der Lernstichprobe aus Individualphänotypen. Allerdings zeigt Abbildung 3, dass dies nur für Merkmale ab einer Heritabilität von ca. 0,20 gilt. Für sehr niedrig erbliche Merkmale

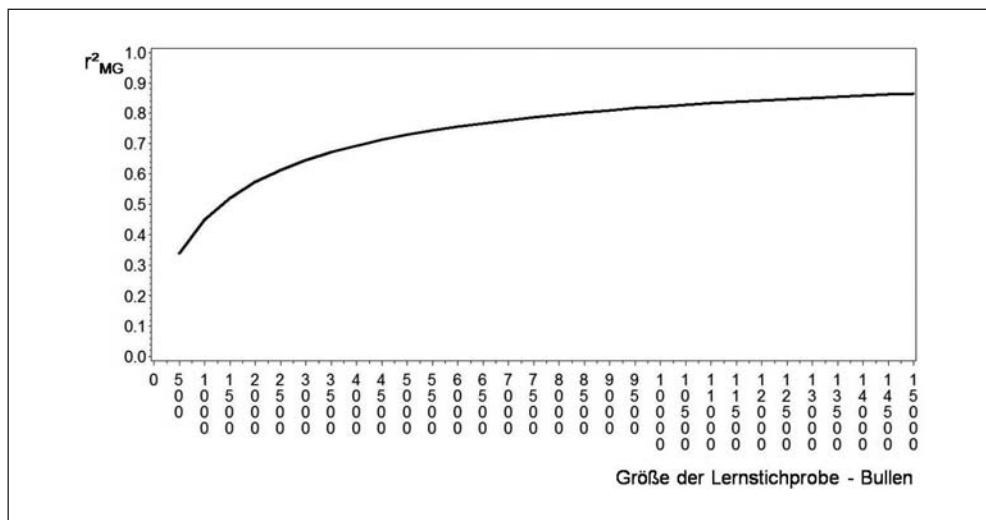


Abb. 2 Sicherheit der genomischen Zuchtwertschätzung (Quadrierte Korrelation zwischen wahren und genomisch geschätztem Zuchtwert) nach der Formel von GODDARD (2008) in Abhängigkeit von der Größe der Lernstichprobe bestehend aus Bullen mit sicher (90 % Sicherheit) geschätzten Zuchtwerten

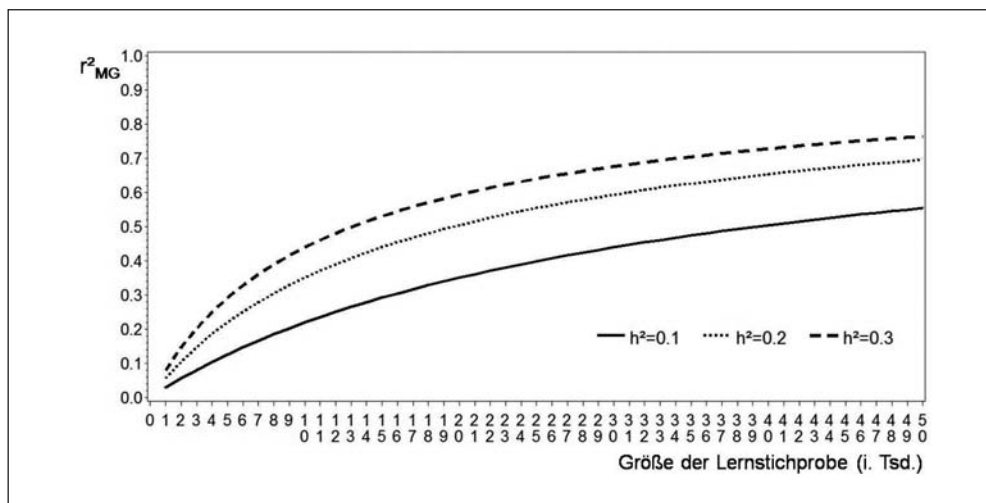


Abb. 3 Sicherheit der genomischen Zuchtwertschätzung (Quadrierte Korrelation zwischen wahren und genomisch geschätztem Zuchtwert) nach der Formel von GODDARD (2008) in Abhängigkeit von der Größe der Lernstichprobe bestehend aus individuellen Phänotypwerten für Heritabilitäten von 0,10, 0,20 und 0,30

kann über Individualphänotypen kaum eine geeignete Lernstichprobe zu derzeit vertretbaren Kosten gebildet werden. Aber auch Kombinationen von Bullen mit sicher geschätzten Zuchtwerten und individuellen Phänotypwerten von Kühen wären möglich. Insgesamt können allerdings Kalibrierungsstichproben aus Individualphänotypen aufgrund der hohen Kosten je Individuum derzeit kaum als praktikabel bezeichnet werden. Dies betrifft vornehmlich die

Analyse der SNP-Arrays im Labor, während für die Sammlung von genotypisierungsfähigem Material von BREM (2006) schon kostengünstige Wege aufgezeigt wurden. Auf das Problem der Merkmale mit niedriger Heritabilität wird später noch einzugehen sein.

3.2 Die Akzeptanz genomischer Zuchtwerte in der Praxis

Zur Frage der Akzeptanz genomischer Zuchtwerte in der Praxis der Züchterschaft und Milchviehhaltung gibt es bislang nur sehr wenige wissenschaftlich fundierte Erkenntnisse. KÖNIG et al. (2009) zeigen in einer Zuchtplanungsrechnung, dass der diskontierte Ertrag für ein Zuchtunternehmen bei Anwendung der Genomischen Selektion erst dann über dem konventionell erzielbaren Ertrag liegt, wenn mehr als 20 % aller Kühe von genomisch selektierten Bullen inseminiert werden. Der diskontierte Züchtungsertrag steigt dann weiter mit der Akzeptanz bis zur 100 %igen Akzeptanz, so wie sie von SCHAEFFER (2006) unterstellt wird. Die Modellkalkulation von KÖNIG et al. (2009) ist eine klassische Zuchtplanungsrechnung, welche die Bedingungen international konkurrierender Zuchtunternehmen, die den Markt für Bullensperma beschicken, nicht abbilden kann. Es bleibt also noch die Frage, welches genetische Niveau konkurrierende Zuchtunternehmen anbieten können, wie es denn auch immer selektiert worden sein mag. Ein Zuchtunternehmen aus einer überlegenen Teilpopulation könnte in einer großen Rasse unter Umständen ein genetisches Niveau, welches auf herkömmliche Art erreicht wurde, anbieten, welches über dem genomisch selektierten Material einer unterlegenen Teilpopulation liegen würde.

In Europa wird es vermutlich erst in diesem Jahr zu einer staatlichen Anerkennung von genomischen Zuchtwerten für Bullen kommen. Die Beantwortung der Frage nach der Akzeptanz durch die Zuchtpraxis selbst steht also noch aus. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist aber die Tatsache, dass bei einer staatlich anerkannten Einführung genomischer Zuchtwerte bzw. bei der dann möglichen breiten Vermarktung derartiger Bullen, ein einmaliger Effekt der Mitnahme von fünf Jahren Zuchtfortschritt realisiert werden kann. Dies ergibt sich daraus, dass üblicherweise erste Vermarktungen von Bullen im Alter von fünf bis sechs Jahren mit noch sehr früh geschätzten Zuchtwerten aus der Nachkommenprüfung stattfinden. Mit der Einführung der offiziellen genomischen Zuchtwertschätzung sind jedoch einjährige Bullen bereits vermarktungsfähig und tragen so im Mittel den Zuchtfortschritt von 5 Jahren in sich. In der deutschen Holstein-Zucht entspricht dies für den Gesamtzuchtwert beispielsweise dem Zuchtfortschritt in der Größenordnung von nahezu einer Standardabweichung, wenn man unterstellt, dass die Sicherheit der genomischen Zuchtwertschätzung derjenigen aus der Nachkommenprüfung ebenbürtig ist. Damit liegen auch die Top-Zuchtwerte aktueller einjähriger Jungbullen um nahezu eine Standardabweichung über den besten Zuchtwerten der jetzt gerade Nachkommen geprüften Bullen. Dieser einfache Zusammenhang sollte der Einführung und der Akzeptanz der genomischen Zuchtwerte den Weg ebnen; in dieser Deutlichkeit gilt er allerdings nicht für Rassen und Populationen mit kleinen Lernstichproben, welche eine niedrigere Sicherheit der genomischen Zuchtwertschätzung aufweisen.

3.3 Welche Tiere sollten genotypisiert werden?

Im von SCHAEFFER (2006) vorgeschlagenen Zuchtprogramm wird unterstellt, dass alle Bullen im Zuchtprogramm (bei der Geburt) sowie alle Bullenmütter zu genotypisieren sind. Dieser Vorschlag ist allerdings für die Bullenmütter zu hinterfragen. Erstens muss unter der-

zeitigen Bedingungen davon ausgegangen werden, dass nicht sämtliche Kühe einer Population potentiell als Bullenmütter mit SNP-Typisierung zur Verfügung stehen. Eine Vorauswahl der Bullenmütter wäre also nötig, welche sich zwar unter Umständen auf genomische Zuchtwerte ihrer Eltern stützen könnte, aber vermutlich auch ihren Phänotypwert enthalten dürfte. Die Selektion von Bullenmüttern im Feld ist aber mit dem Problem der den geschätzten Zuchtwert verzerrenden Sonderbehandlung behaftet. Weiter liefert die potentielle Bullenmutter selbst durch wenige Eigenleistungen nur sehr ungenaue Zuchtwerte für niedrig erbliche funktionale Merkmale. Für diese Merkmale kann also nicht davon ausgegangen werden, dass wirklich eine hohe Selektionsschärfe für Bullenmütter bei der Vorauswahl zur Typisierung erzielt werden kann. Eine Auswahl potentieller Bullenmütter nach genomischen Zuchtwerten der Eltern (wenn denn überhaupt ein genomischer Zuchtwert für die Mutter der Bullenmutter verfügbar wäre) ändert nichts an der Tatsache, dass jeweils eine Meiose bei Vater und Mutter noch zwischen ihrem Pedigree-Zuchtwert und ihrem eigenen additiv-genetischen Wert stehen würde.

Dasselbe Argument gilt zweitens für den Schritt von Bullenmutter zum Sohn, auch hier bringt eine weitere Meiose Zufälligkeiten, die, bezogen auf das vom Zuchtunternehmen gewünschte Produkt, den Jungbullen, eigentlich unerwünscht sind. Zwar würde natürlich auch der Jungbulle noch typisiert, es müsste aber hinsichtlich der Vorauswahl potentieller Kandidaten wiederum vorgehalten werden, um unerwünschte Varianten auszuschließen. Damit stellt sich schließlich die Frage, ob nicht jegliche Genomische Selektion direkt beim erwünschten Produkt, dem Jungbullen, ansetzen sollte, wenn es gilt, eine optimale Balance zwischen Typisierungskosten und Selektionsintensitäten auf den verschiedenen Pfaden der Selektion zu finden. Dies ist der Grundgedanke des sogenannten Bullenkälberzuchtprogramms, welches KÖNIG und SWALVE (2009) in einer Modellkalkulation vorgeschlagen haben. In der genannten Studie konnte gezeigt werden, dass eine Auswahl von potentiellen Bullen für den Besamungseinsatz aus Bullenkälbern selbst dann erfolversprechend ist, wenn lediglich zufällig aus der Population gezogene Bullenkälber betrachtet werden, wobei allerdings anschließend auf der Basis der genomischen Zuchtwerte scharf ($< 0,1\%$) selektiert wird. Diese Schlussfolgerung ist somit nur als Anregung zu sehen, die aufzeigt, was überhaupt möglich ist. Bei einer tatsächlichen praktischen Umsetzung könnte der Vorschlag auch leicht in der Weise variiert werden, dass nur in besseren Herden und von den in diesen Herden stehenden überlegenen Kühen Bullenkälber zur Typisierung herangezogen werden. Doch auch bei dieser Verfeinerung verbleibt das Problem der Kosten. Zukünftig denkbare Szenarien sind einerseits die drastische Kostenreduktion heute erhältlicher *High-density*-Arrays und andererseits der Einsatz von *Low-density*-Arrays, welche entweder nur wenige (< 500) ausgewählte SNP (WEIGEL et al. 2009) oder ca. 4000 gleichmäßig über das Genom verteilte SNP enthalten (WEIGEL 2010, pers. Mitt.). Im letzteren Fall ist über das sogenannte *Imputing*-Verfahren eine Rekonstruktion der SNP-Genotypen für nicht auf dem Array befindliche SNP zur Anpassung an *High-density*-Arrays möglich, und der Genauigkeitsverlust gegenüber den hochdichten Chips kann sehr gering gehalten werden. Mit dieser Technologie werden also gleichzeitig zwei Fragen der in diesem Beitrag erörterten Punkte berührt: Die Frage nach der Möglichkeit, große Lernstichproben aus Individualphänotypen zusammenzustellen, und die Frage danach, welche Tiere innerhalb eines Zuchtprogrammes zu typisieren sind. Eigentlich ist letztere Frage lediglich die konsequente und simple Umsetzung eines sehr alten Prinzips der Tierzucht: Scharfe Selektion führt zu einem hohen Zuchterfolg, deshalb sollten möglichst viele Tiere geprüft werden.

4. Testherden in Zuchtprogrammen für Milchrinder

Der Begriff der Testherden entstammt ursprünglich der Beschreibung von Zuchtprogrammen für Milchrinder, bei denen die Nachkommenprüfung der Jungbullen ausschließlich oder vornehmlich in vertraglich an die Zuchtorganisation gebundenen Herden stattfindet. In diesen Herden wird Jungbullensperma zu einem hohen Anteil (> 50 %) eingesetzt. Für die Zuchtorganisation ergeben sich Vorteile bei der Organisation der Nachkommenprüfung, die im Extremfall konkret nach Versuchsplan gestaltet werden kann. Insbesondere ergeben sich auch Vorteile dadurch, dass die Palette der zu prüfenden Merkmale gegebenenfalls erweitert werden kann, wenn eine flächendeckende Erfassung derartiger neuer Merkmale aus Kostengründen kaum denkbar wäre. In der Arbeit von SWALVE und KÖNIG (2007) wird dieser Ansatz mit dem Vorschlag von SCHAEFFER (2006) für ein genomisches Zuchtprogramm verknüpft.

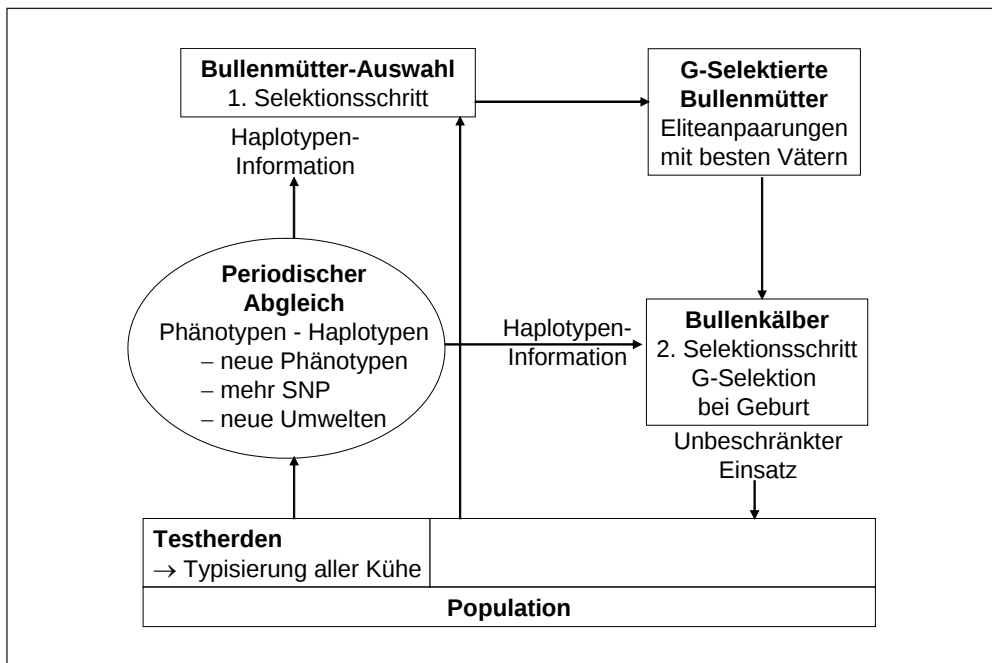


Abb. 4 Schema eines Zuchtprogramms zur Weiterführung der Genomischen Selektion (nach SWALVE und KÖNIG, 2007)

Abbildung 4 zeigt ein Schema für ein genomisches Zuchtprogramm mit Testherden. In den Testherden sind alle Kühe typisiert und können somit als Lernstichprobe dienen bzw. erweitern eine Lernstichprobe aus Bullen. Aufgrund neuer Anforderungen ist die räumlich begrenzte Leistungsprüfung für neue Merkmale bzw. Phänotypwerte möglich. Auch eine Aufteilung in verschiedene Subumwelten ist grundsätzlich denkbar. Der Rest des Schemas ist mit demjenigen aus Abbildung 1 identisch. Zusammenfassend dienen die Testherden in einem genomischen Zuchtprogramm folgenden Zwecken (SWALVE 2008):

- Bildung der Grundlage der Merkmalerfassung für neue Merkmale;
- Schaffung der Grundlage für zukünftige Lernstichproben;
- laufende Überprüfung der Zuchtarbeit insbesondere bei Merkmalen, welche nur indirekt züchterisch bearbeitet werden;
- akkurate Erfassung des möglichen Auftretens genetisch bedingter Defekte.

Der dritte Punkt berührt diejenigen Merkmale, für die eine direkte Erfassung in der breiten Population kaum einführbar ist. Ein Beispiel ist die Eutergesundheit, welche üblicherweise über den Gehalt an somatischen Zellen in der Milch züchterisch bearbeitet wird – aber damit keineswegs im eigentlichen Sinne erschöpfend geprüft ist. In Testherden könnte die Eutergesundheit neben der Erfassung des Zellgehaltes auch direkt über Krankheitsdaten erfasst werden.

Die ersten drei Punkte sind miteinander eng verzahnt: Neue Merkmale werden aufgrund ökonomischer oder sonstiger Gründe in das Zuchtziel aufgenommen, sollen damit auch in die Genomische Selektion integriert werden und müssen hinsichtlich der züchterischen Effekte auch noch laufend weiter geprüft werden.

Die zukünftigen Themenfelder für die Zuchtzielgestaltung beim Milchrind sind neben den Merkmalen der Milchleistung insbesondere funktionale Merkmale und Merkmale der Gesundheit, der Beitrag der Milchviehhaltung zum Klimaschutz sowie die Produktqualität (spezifische Inhaltsstoffe). Auf die Themen Klimaschutz und Produktqualität soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass eine züchterische Verbesserung von Merkmalen auf diesen Themengebieten nicht auf einer flächendeckenden Leistungsprüfung im herkömmlichen Sinne basieren wird.

Auch heute schon stehen funktionale Merkmale und Merkmale der Gesundheit bzw. Krankheitsresistenz im Fokus züchterischer Anstrengungen in Milchrinderzuchtprogrammen. Für die Erfassung bzw. Leistungsprüfung von Krankheitsmerkmalen kann man die Formen der Leistungsprüfung, wie in Abbildung 5 angegeben, gliedern (SWALVE 2007).

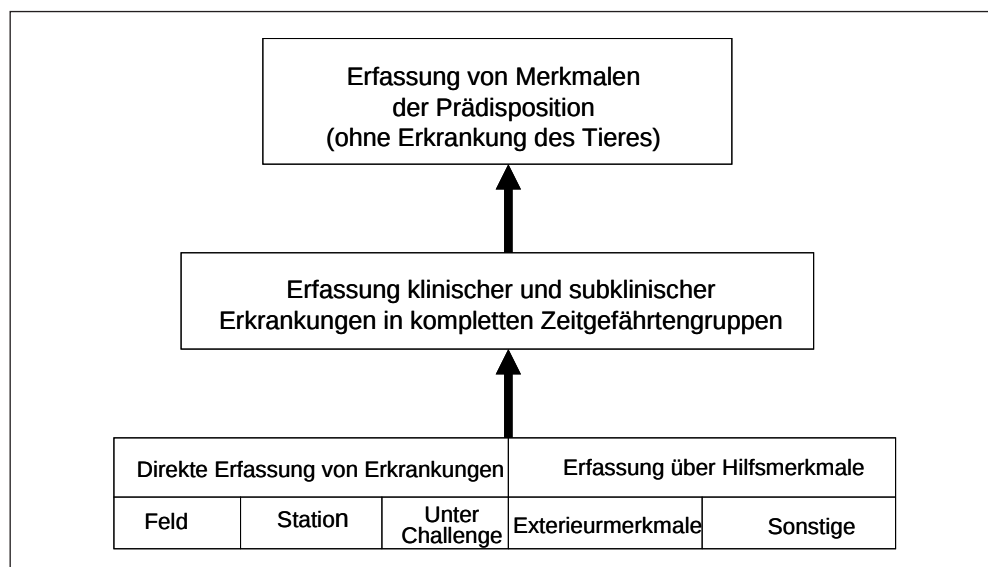


Abb. 5 Leistungsprüfung für Krankheitsmerkmale nach SWALVE (2007)

Die einfachste Form der Erfassung ist das bloße Sammeln von Daten aus der Feld- bzw. der Stationsprüfung, wobei die Challenge-Umwelt eigentlich schon einen verstärkten Eingriff darstellt. Der wesentliche Grundsatz jeder Leistungsprüfung beim Nutztier ist aber, nicht einfach nur Daten zu sammeln, sondern Festlegungen hinsichtlich der zu prüfenden Zeitgefahrntengruppe zu treffen. Die allererste Vorschrift wäre dabei diejenige, dass immer eine vollständige Zeitgefahrntengruppe (z. B. Herde) zu einem Zeitpunkt geprüft wird. Nur mit diesem Vorgehen ist eine anschließende statistisch saubere Korrektur der Daten für Umwelteinflüsse möglich. Schließlich wird es nötig sein, Merkmale zu entwickeln, welche eine Aussage über die Prädisposition für eine Krankheit erlauben, ohne dass Erkrankungen schon vorliegen. Dies können z. B. physiologische Marker oder natürlich auch genetische Marker sein.

Zum Thema Leistungsprüfung für funktionale Merkmale und Merkmale der Gesundheit wird häufig eingewendet, dass auf diesem Gebiet gemachte Anstrengungen ohnehin nur einen begrenzten Erfolg haben würden, weil die Heritabilität dieser Merkmale niedrig sei. Hierzu ist zu sagen, dass es die ureigenste Aufgabe des Tierzüchters ist, Merkmale so zu definieren bzw. neu zu schaffen und in möglichst standardisierter Form zu prüfen, dass jeweils die Heritabilität innerhalb der vorgegebenen, aber meist weiten biologischen Grenzen maximiert wird.

Im Folgenden seien hinsichtlich der Maximierung der Heritabilität für gemeinhin als niedrig erblich angesehene Merkmale zwei Beispiele genannt. Gerade beim Milchrind ergeben Schätzungen für die Heritabilität der Reproduktionsmerkmale auf der Basis von Besamungsdaten üblicherweise nur sehr niedrige Werte in der Größenordnung von wenigen Prozent. Der gesamte Komplex der Fruchtbarkeit zerfällt physiologisch gesehen in sehr unterschiedliche Teilkomplexe, von denen hier die wichtigsten genannt werden sollen: Nach einer Kalbung können zunächst klinische Störungen der Reproduktionsorgane auftreten, anschließend ist zu fragen, wann überhaupt ein regelmäßiger Zyklus wieder einsetzt, Brunstsymptome können unterschiedlich stark ausgeprägt sein, die Ovulation kann gestört sein, die Befruchtung selbst ist nicht beobachtbar, aber von zentraler Bedeutung, danach sollte eine Implantation erfolgen, und schließlich sollte die Trächtigkeit auch aufrecht erhalten bleiben. Mit einem herkömmlichen Merkmal wie der Zwischenkalbezeit wird versucht, alle genannten Vorgänge in einem Parameter zusammenzufassen, obschon offensichtlich ist, dass sehr unterschiedliche physiologische Vorgänge und damit wohl auch Gene eine Rolle spielen. Ein Ansatz für neue Merkmale ist es nun, einzelne, physiologisch enger gefasste Merkmale auch einzeln zu erfassen. In Arbeiten aus Schottland und Schweden (ROYAL et al. 2002a, b, PETERSSON et al. 2007) wurde ein Ansatz gefahren, durch eine Bestimmung des Progesterongehaltes in der Milch nach der Kalbung den Zeitpunkt des Wiedereinsetzens des Zyklus direkt zu ermitteln. Hierzu sind nicht unbedingt tägliche Bestimmungen, sondern Messungen in einer Frequenz von ein- bis zweimal wöchentlich erforderlich. Aus der Häufigkeit der Werte über einem bestimmten Grenzwert können dann geeignete metrische Variablen abgeleitet werden. Heritabilitätsschätzungen ergaben Werte in der Größenordnung von 0,10 bis 0,30 je nach Probenfrequenz und Definition des Merkmals. Der Aufwand für Probengewinnung und Laborarbeit – wobei es heute sogar *On-farm*-Analysegeräte gibt – ist natürlich für eine ganze Milchrinderpopulation kaum zu leisten, für eine Subpopulation von Testherden ist es aber ein gangbarer Weg.

Das zweite Beispiel ist die Erhebung von Befunden zu Krankheiten und Aberrationen an der Klaue beim Klauenschnitt. Seit 2002 besteht in der Arbeitsgruppe des Autors eine Zusammenarbeit mit einem professionellen Klauenpfleger, der schon seit dem Jahr 2000 seine gesamte Arbeit und alle Befunde per Hand-Held-Computer dokumentiert. Mittlerweile ist die resultierende Datenbank auf 79000 Befunde von 26000 Kühen (regelmäßige, mehrfache Klauenpflege je

Kuh) angewachsen und die Grundlage für eine Reihe von Untersuchungen gewesen. Insgesamt werden 17 verschiedene Befunde je Gliedmaße dokumentiert, wobei subklinische wie klinische Fälle erfasst werden. Entscheidend ist auch, dass jeweils die gesamte Herde zu einem Zeitpunkt der Klauenpflege unterzogen wird. Dieser Umstand erfüllt somit die wesentliche, oben schon erläuterte Anforderung der Erfassung einer kompletten Zeitgefährtengruppe. Hinsichtlich der Schätzung der Heritabilität ergeben sich je nach Befund (Krankheit) und Auswertungsmodell Werte in der Größenordnung von 0,10 bis 0,30 (SWALVE et al. 2008). Herkömmlich wird die züchterische Verbesserung des Fundaments nur auf der Basis von Beschreibungen des Exterieurs betrieben. Derartige Phänotypen sind aber vom Zielmerkmal, der direkten Beschreibung des Gesundheitszustands, weit entfernt und auch nicht geeignet, zu einem nennenswerten Zuchtfortschritt in der Klauengesundheit beizutragen (KÖNIG und SWALVE 2006). Es kann eingewendet werden, dass trotz der Größe und Aussagefähigkeit des vorhandenen Datenmaterials aus der Klauenpflege keine Verallgemeinerungen getroffen werden dürfen. Natürlich bedeutet dies Beispiel nicht, dass es möglich wäre, flächendeckend über eine ganze Population ein derartig qualitativ hochwertiges Erfassungssystem zu implementieren. Wiederum gilt aber, dass dies unter engagierter zentraler Anleitung auch mit mehreren Klauenpflegern in einer Testherden-Subpopulation möglich sein müsste.

Beide Beispiele zeigen, dass bei intensiver Bemühung und unter Verzicht auf einen flächendeckenden Anspruch neue Merkmale im Komplex Funktionalität und Gesundheit „geschaffen“ werden können, welche auch den Anforderungen an die Zusammenstellung einer Lernstichprobe aus Individualphänotypen gerecht werden würden, also nicht extrem niedrige Heritabilitäten aufweisen. Damit wird für die Zukunft ein „Standard-Zuchtprogramm“ nach dem Schema in Abbildung 4 immer wahrscheinlicher.

5. Schlussfolgerungen

Die Genomische Selektion beim Milchrind auf der Basis von hochdichten SNP-Arrays ist tatsächlich als eine revolutionäre Veränderung der Zuchtmethoden anzusehen und historisch lediglich mit der Einführung der künstlichen Besamung vergleichbar. Dabei ist die Größe der Lernstichprobe ein ganz wesentlicher Faktor zur Erzielung hoher Sicherheiten der Zuchtwertschätzung. Zukünftig werden Lernstichproben nicht nur aus Genotypwerten von Bullen mit sehr sicher geschätzten Zuchtwerten bestehen, sondern auch aus individuellen Phänotypwerten von typisierten Kühen gebildet werden. Dies gilt nicht nur für große Populationen und Rassen, sondern auch für kleine Populationen, bei denen die erforderliche Anzahl sicher geprüfter Bullen kaum zusammengestellt werden kann. Gleichzeitig ist zu beachten, dass zukünftige Zuchtziele und Prüfmerkmale für diese Zuchtziele gerade auf den Gebieten Funktionalität, Gesundheit, Klimaschutz und Produktqualität es erfordern werden, dass eine Reihe von neuen Merkmalen die bisherige Merkmalspalette teilweise ersetzen und teilweise ergänzen wird. Für jedes neue Merkmal sind aber damit auch gleichzeitig neue Lernstichproben nötig, welche nicht über den Rückgriff auf zurückliegende Bullengenerationen gebildet werden können. Auch dieser Umstand spricht dafür, zukünftig Lernstichproben aus Kühen in Testherden in Ergänzung zu den vermutlich wenigen neuen Bullen, welche sichere Zuchtwerte in neuen Merkmalen aufweisen, zu bilden.

Hinsichtlich der Frage, welche Tiere als Kandidaten für potentielle Selektionsentscheidungen zu typisieren sind, gilt der simple Grundsatz, dass um so schärfer selektiert werden

kann, je mehr Tiere geprüft wurden. Für die Milchrinderzucht ist auch entscheidend, dass das zu vermarktende Produkt einer Zuchtorganisation der Bulle ist. Folglich sollten in möglichst großer Stückzahl Bullenkälber typisiert werden, wobei auch ein sogenannter *Low-density*-Array zur Anwendung kommen kann, wenn dies denn die Kosten entscheidend senkt.

Literatur

- AGUILAR, I., MISZTAL, I., JOHNSON, D. L., LEGARRA, A., TSURUTA, S., and LAWLOR, T. J.: Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J. Dairy Sci.* 93, 743–752 (2010)
- AiPL*: SNP marker effects. http://aipl.arsusda.gov/Report_Data/Marker_Effects/marker_effects.cfm (2009)
- BERRY, D. P., KEARNEY, F., and HARRIS, B. F.: Genomic selection in Ireland. *Proc. Interbull Workshop of Genomic Information in Genetic Evaluations*, Uppsala, Sweden. *Interbull Bulletin* (Uppsala) 39, 29–34 (2009)
- BREM, G.: Technologische Entwicklungen für die Beprobung von Nutztierpopulationen zum landesweiten Einsatz molekularbiologischer Analysen. *Züchtungskunde* 78, 401–414 (2006)
- DAETWYLER, H. D., VILLANUEVA, B., and WOOLLIAMS, J. A.: Accuracy of predicting the genetic risk of disease using a genome-wide approach. *PLoS ONE* 3/10, e3395 doi:10.1371/journal.pone.0003395 (2008)
- DEKKERS, J. C. M., and HOSPITAL, F.: The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Rev. Genet.* 3, 22–31 (2002)
- DHV: Eurogenomics verbessert signifikant die Sicherheit der Genomischen Zuchtwertschätzung. Pressemitteilung DHV und VIT, 4. März 2010
- DUCROCQ, V., FRITZ, S., GUILLAUME, F., and BOICHARD, D.: French report on the use of genomic evaluation. *Proc. Interbull Workshop of Genomic Information in Genetic Evaluations*, Uppsala, Sweden. *Interbull Bulletin* (Uppsala) 39, 17–22 (2009)
- FERNANDO, R. L., and GROSSMAN, M.: Marker assisted selection using best linear unbiased prediction. *Genetics Selection Evolution* 21, 467–477 (1989)
- GELDERMANN, H.: Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. *Theoretical and Applied Genetics* 46, 310–330 (1975)
- GODDARD, M. E.: Genomic selection: Prediction of accuracy and maximisation of long term response. *Genetica*. doi: 10.1007/s10709-008-9308-0 (2008)
- HABIER, D., TETENS, J., SEEFRIED, F. R., LICHTNER, P., and THALLER, G.: The impact of genetic relationship information on genomic breeding values in German Holstein cattle. *Genetics Selection Evolution* 42/5 (2010)
- HARRIS, B. L., and JOHNSON, D. L.: Genomic predictions for New Zealand dairy bulls and integration with national genetic evaluation. *J. Dairy Sci.* 93, 1243–1252 (2010)
- HARRIS, B. L., JOHNSON, D. L., and SPELMAN, R. J.: Genomic selection in New Zealand and the implications for national genetic evaluation. *Proc. Interbull Meeting*, Niagara Falls, NY., ICAR Techn. Series No. 13, 325–330 (2008)
- HAYES, B. J., BOWMAN, P. J., CHAMBERLAIN, A. J., and GODDARD, M. E.: Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *J. Dairy Sci.* 92, 433–443 (2009a)
- HAYES, B. J., DAETWYLER, H. D., BOWMAN, P., MOSER, G., TIER, B., CRUMP, R., KHATKAR, M., RAADSMA, H. W., and GODDARD, M. E.: Accuracy of genomic selection: comparing theory and results. *Proc. 18th Conf. AAABG*, Barossa Valley, South Australia, 28. September bis 1. Oktober 2009 (2009b)
- HENDERSON, C. R.: Sire evaluation and genetic trend. *Proc. Anim. Breed. Genet. Symp. in Honor of J. L. Lush*. ASAS and ADSA, Champaign, Ill. 10–41 (1973)
- KÖNIG, S., SIMIANER, H., and WILLAM, A.: Economic evaluation of genomic breeding programs. *J. Dairy Sci.* 92, 382–391 (2009)
- KÖNIG, S., und SWALVE, H. H.: Modellkalkulationen zu züchterischen Möglichkeiten auf Klauengesundheit beim Milchrind. *Züchtungskunde* 78, 345–356 (2006)
- KÖNIG, S., and SWALVE, H. H.: Application of selection index calculations to determine selection strategies in genomic breeding programs. *J. Dairy Sci.* 92, 5292–5303 (2009)
- LANDE, R., and THOMPSON, R.: Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124, 743–753 (1990)
- LIU, Z., SEEFRIED, F., REINHARDT, F., and REENTS, R.: Dairy cattle genetic evaluation using genomic information. *Proc. Interbull Workshop of Genomic Information in Genetic Evaluations*, Uppsala, Sweden. *Interbull Bulletin* (Uppsala) 39, 23–28. *Interbull*, Uppsala, Sweden (2009)

- MACKINNON, M. J., and GEORGES, M. A. J.: Marker-assisted preselection of young sires prior to progeny-testing. *Livestock Production Science* 54, 229–250 (1998)
- MEUWISSEN, T. H. E., HAYES, B., and GODDARD, M. E.: Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819–1829 (2001)
- MOSER, G., TIER, B., CRUMP, R. E., KHATKAR, M. S., and RAADSMA, H. W.: A comparison of five methods to predict genomic breeding values of dairy bulls from genome-wide SNP markers. *Genetics Selection Evolution* 41/56 (2009)
- PETERSSON, K. J., BERGLUND, B., STRANDBERG, E., GUSTAFSSON, H., FLINT, A. P. F., WOOLLIAMS, J. A., and ROYAL, M. D.: Genetic analysis of postpartum measures of luteal activity in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 427–434 (2007)
- ROOS, A. P. W. DE, SCHROOTEN, C., MULLAART, E., VAN DER BEEK, S., DE JONG, G., and VOSKAMP, W.: Genomic selection at CRV. *Proc. Interbull Workshop of Genomic Information in Genetic Evaluations*, Uppsala, Sweden. *Interbull Bulletin* (Uppsala) 39, 47–50 (2009)
- ROYAL, M. D., FLINT, A. P. F., and WOOLLIAMS, J. A.: Genetic and phenotypic relationships among endocrine and traditional fertility traits and production traits in Holstein-Friesian dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 958–967 (2002a)
- ROYAL, M. D., PRYCE, J. E., WOOLLIAMS, J. A., and FLINT, A. P. F.: The genetic relationship between commencement of luteal activity and calving interval, body condition score, production and linear type traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 3071–3080 (2002b)
- SCHAEFFER, L. R.: Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 123, 218–223 (2006)
- SU, G., GULDBRANDTSEN, B., GREGERSEN, V. R., and LUND, M. S.: Preliminary investigation on reliability of genomic estimated breeding values in the Danish Holstein population. *J. Dairy Sci.* 93, 1175–1183 (2010)
- SWALVE, H. H.: Züchterische Möglichkeiten zur Verbesserung der Tiergesundheit. *Züchtungskunde* 80/1, 5–10 (2007)
- SWALVE, H. H.: Recording of functional traits in contract herds for progeny testing of bulls in dairy cattle breeding programs. *Proc. 59th Annu. Mtg. Eur. Assoc. Anim. Prod.*, Vilnius, Lithuania (2008)
- SWALVE, H. H., ALKHODER, H., and PIJL, R.: Estimates of breeding values for sires based on diagnoses recorded at hoof trimming: Relationships with EBV for conformation traits. *Proc. Interbull Meeting*, Niagara Falls, NY. *Interbull Bulletin* (Uppsala) 38, 87–90 (2008)
- SWALVE, H. H., und KÖNIG, S.: Testherden in Zuchtprogrammen für Milchrinder. 1. Mitteilung: Allgemeine Überlegungen. *Züchtungskunde* 79/4, 429–262 (2007)
- The Bovine HapMap Consortium*: Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science* 324, 528 (2009)
- VANRADEN, P. M., VAN TASSELL, C. P., WIGGANS, G. R., SONSTEGARD, T. S., SCHNABEL, R. D., TAYLOR, J. F., and SCHENKEL, F. S.: Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 92, 16–24 (2009)
- VISSCHER, P. M.: Sizing up human height variation. *Nature Genet.* 40/5, 489–490 (2008)
- WEIGEL, K. A., DE LOS CAMPOS, G., GONZÁLEZ-RECIO, O., NAYA, H., WU, X. L., LONG, N., ROSA, G. J. M., and GIANOLA, D.: Predictive ability of direct genomic values for lifetime net merit of Holstein sires using selected subsets of single nucleotide polymorphism markers. *J. Dairy Sci.* 92, 5248–5257 (2009)

Prof. Dr. Hermann H. SWALVE
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Theodor-Lieser-Straße 11
06120 Halle (Saale)
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: 49 345 55 22321
Fax: 49 345 55 27105
E-Mail: hermann.swalve@landw.uni-halle.de

Continents under Climate Change

Konferenz aus Anlass des 200. Gründungsjubiläums der Humboldt-Universität zu Berlin in Zusammenarbeit mit dem Potsdam-Institut für Klimafolgenforschung (PIK) und der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Unter der Schirmherrschaft des Auswärtigen Amtes der Bundesrepublik Deutschland

vom 21. bis 23. April 2010 in Berlin

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 112, Nr. 384

Herausgegeben von Wilfried ENDLICHER (Berlin) und Friedrich-Wilhelm GERSTENGARBE (Potsdam)

(2010, 320 Seiten, 103 Abbildungen, 17 Tabellen, 27,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-2795-3)

Der Klimawandel gehört zu den drängendsten globalen Problemen unserer Zeit. Die Menschheit steht vor besonderen Herausforderungen, um insbesondere den CO₂-Ausstoß zu senken. Führende Wissenschaftler aus der Klimaforschung betrachten die Auswirkungen des Klimawandels auf die Kontinente Europa, Asien, Afrika, Amerika und Australien sowie die Polarregionen. Dabei werden neueste Klimadaten unter globalen und regionalen Gesichtspunkten ausgewertet und Simulationsmodelle für zukünftige Entwicklungen diskutiert. Die Ausführungen bieten ein gut fundiertes Bild der Klimaänderungen, die sich weltweit bereits vollziehen bzw. in Zukunft ereignen werden, und untersuchen kritisch die Folgen für Natur, Gesellschaft und Wirtschaft. Der Kongress „Continents under Climate Change“ wurde im Rahmen der 200. Jahrfeier der Humboldt-Universität zu Berlin vom Potsdam-Institut für Klimaforschung und der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften veranstaltet. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

Anwendungen der Individualtypisierungen beim Milchrind

Gudrun A. BROCKMANN, Ralf H. BORTFELDT und Lea G. ZIELKE (Berlin)

Mit 4 Abbildungen und 1 Tabelle

Zusammenfassung

Neben DGAT1 (Diacylglycerol-O-acyltransferase 1) wurden die aus humanen genomweiten Assoziationsstudien bekannten Adipositas-assoziierte Kandidatengene *BDNF* (*Brain-derived neurotrophic factor*) und *FTO* (*Fat mass and obesity associated gene*) ausgewählt, um deren Einfluss auf die Fettmenge der Milchkühe zu untersuchen. Die Untersuchungen wurden an ca. 2400 Bullen der Rasse Deutsche Holstein durchgeführt und die Ergebnisse an einer Population von ca. 1500 Milchkühen unter Produktionsbedingungen verifiziert. Die Effekte der beiden untersuchten humanen Gene *BDNF* und *FTO* erklärten 2,20 und 0,125 % der Varianz im Originalzuchtwert für die durchschnittliche Fettmenge in der 1. bis 3. Laktation in der untersuchten Bullenpopulation. Die Ergebnisse konnten unter Praxisbedingungen in der Kuhpopulation bei Verwendung der Eigenleistungsdaten bestätigt werden. Die bei den Bullen und bei den Kühen gefundenen Effekte sind für die untersuchten Gene ähnlich. Die vorgestellten Untersuchungen haben gezeigt, dass Gene wie *BDNF* und *FTO*, die beim Menschen den Fettansatz beeinflussen, Einfluss auf die Milchfettmenge beim Rind haben. Vergleichende Untersuchungen der Effekte von SNP-Allelen und Haplotypen zeigen, dass Haplotypen bei allen untersuchten Genen einen genaueren Informationsgehalt besitzen als die einzelnen SNPs, die den Haplotypenblock bilden. Die „Fettgene“ könnten über ihre Rolle für die Energiebalance auch zur Tiergesundheit und Reproduktion beitragen.

Abstract

Beside *DGAT1* (Diacylglycerol-O-acyltransferase 1), the candidate genes *BDNF* (Brain-derived neurotrophic factor) and *FTO* (Fat mass and obesity associated gene), which were shown to be associated with adiposity in genome-wide association studies in human, were selected to investigate their impact on the fat yield of dairy cows. The analyses were conducted with about 2,400 bulls of the breed *Deutsche Holstein* and results were validated in a population of about 1,500 dairy cows under production conditions. Effects of the genes *BDNF* and *FTO* explained 2.20 % and 0.125 %, respectively, of the variance in the original breeding value within the analysed bull population and for the averaged fat yield over lactations one to three. These results were reproducible under production conditions using milk performance data of the reference dairy cow population. Effects found in the bull and cow population are similar for the analysed genes. The herein presented results demonstrate that genes like *BDNF* and *FTO*, not only influence body fat in human, but as well affect the milk fat content in dairy cattle. Analyses of allele effects showed that haplotypes carry larger information content than the single SNPs that form the haplotype block. Due to their role in energy balance, these “fat genes” may contribute to animal health and reproduction.

1. Einleitung

Das Ziel der modernen Genomanalyse besteht in der umfassenden Typisierung des Genoms eines Tieres und der Nutzung dieser genetischen Information für die möglichst zuverlässige Vorhersage seiner Eigenschaften. Gegenwärtig werden deshalb große Anstrengungen unter-

nommen, genomische Zuchtwerte mit höchster Genauigkeit zu berechnen. Um eine hohe Genauigkeit in der genomischen Zuchtwertschätzung zu erreichen, sind umfangreiche Voruntersuchungen an großen Populationen notwendig, in denen genetische Assoziationen zwischen genetischen Markern und Leistungs- oder Fitnessmerkmalen analysiert werden. Je mehr Marker am Einzeltier getestet werden und je dichter die Marker das gesamte Genom abdecken, desto treffsicherer und lückenloser können Assoziationen zwischen Markern und Merkmalen in einer begrenzten Populationsgröße aufgedeckt werden. Der Umfang und die Struktur der Population sind von besonderer Bedeutung für die sichere Schätzung der Richtung und Größe der Effekte an den merkmalsassoziierten Orten im Genom. In den vergangenen zwei Jahren wurde in breitem Umfang die Typisierung von Einzelbasenpaarpolymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphism* = SNP) mittels der allelspezifischen Chip-Hybridisierungstechnologie durchgeführt. Für das Rind standen dafür die 54 001 bovinen SNP-tragenden BovineSNP50-Beadchips (MATUKUMALLI et al. 2009) der Firma Illumina zur Verfügung. Von den auf dem Chip verankerten SNPs sind etwa 84 % in der Deutschen Holstein-Population informativ. Darunter werden SNPs verstanden, von denen zwei Allele in der Population auftreten, wobei in der Regel eine minimale Allelfrequenz von 1 % zugrunde gelegt wird (CHAN et al. 2009, KHATKAR et al. 2008).

Gegenwärtig findet ein 600 000 SNP tragender Chip Einzug in Untersuchungen des Genoms von Rindern in verschiedenen Populationen. Damit kann das Genom noch dichter mit genetischen Markern abgedeckt werden, was einen höheren Gehalt an genetischer Information verspricht und damit eine höhere Genauigkeit und Lückenlosigkeit in der Identifizierung von Markern, die mit Merkmalen assoziiert sind, erwarten lässt. Durch eine dichtere Charakterisierung des Genoms kann die Schätzung der Effekte der Allelvarianten zuverlässiger erfolgen.

Die enorme genomische Informationsdichte kann neben der Vorhersage von genomischen Zuchtwerten auch genutzt werden, um einzelne Merkmale hinsichtlich der molekularen Determination genetischer Effekte genauer zu betrachten. In dieser Studie wurden Individualtypisierungen von 2402 Deutsche Holstein-Zuchtbullen, die mit dem BovineSNP50-Beadchip erzeugt wurden (MATUKUMALLI et al. 2009), genutzt, um Gene genauer zu analysieren, die potentiell Einfluss auf den Energiehaushalt eines Tieres nehmen können. Gene, für die in dieser Bullenpopulation signifikante genetische Effekte nachgewiesen werden konnten, wurden nachfolgend in einer unabhängigen Population von 1467 Kühen typisiert, um die Effekte zu bestätigen und damit die Zuverlässigkeit der Ergebnisse aus der Bullenpopulation zu erhöhen. Außerdem konnte mit den Daten gezeigt werden, welchen Vorteil die Auswertung von Haplotypen gegenüber der von einzelnen SNPs hat.

2. Milchfettmenge und Energiehaushalt

Die während der Laktation erzeugte und vom Tier abgegebene Milchfettmenge ist ein wesentlicher Bestandteil des Energiehaushalts einer Kuh. Damit ist die Regulation der mit der Milch abgegebenen Fettmenge außerordentlich bedeutsam für die Energiehomöostase eines Tieres. Die Gesundheit der Milchkuh ist in hohem Maße von der Aufrechterhaltung der Energiebalance abhängig. Diese wird durch die Energieaufnahme, den Energieverbrauch und die Energieabgabe bestimmt. Die Energieaufnahme wird durch die Futteraufnahme begrenzt. Der Energieverbrauch schließt die Stoffwechselleistung, die Mobilisierung von Energieressour-

cen, insbesondere im Fettgewebe und im Muskel, und die Speicherung überflüssiger Energie wiederum in Form von Fett oder Proteinen ein. Ein wesentlicher Teil der Energie wird durch Thermogenese und bei der laktierenden Kuh in Form der erzeugten Milch abgegeben. In der Milch liefert das MilCHFett den größten Teil der Energie. Um den Energiebedarf für die Synthese von MilChinhaltsstoffen zu decken, werden insbesondere im ersten Laktationsdrittel Körperenergiegedepots mobilisiert.

Etwa die Hälfte der Energie in der Milch stammt aus dem MilCHFett (JENSEN 1995, SCHLIMME und BUCHHEIM 1999, Tab. 1). Die Heritabilität der Fettmenge ist hoch. Sie wird mit durchschnittlich 0,60 angegeben (BRADE und FLACHOWSKY 2005). Die Korrelationskoeffizienten zwischen dem Fettgehalt und der Fettmenge werden mit 0,28 bis 0,38 für die phänotypische Korrelation und 0,06 bis 0,30 für die genetische Korrelation beziffert (FAHR 2003). Die phänotypische Korrelation zwischen Eiweißgehalt und Fettmenge beträgt 0,11 bis –0,02 und die genetische Korrelation –0,01 bis –0,33 (FAHR 2003). Der Fett-Eiweiß-Quotient wird häufig herangezogen, um die Stoffwechselleistung eines Tieres zu beurteilen. Dabei wird ein Grenzwert von 1,5 empfohlen, der bei Überschreitung einen Hinweis auf Stoffwechselstörungen geben soll. In mehreren Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass ein Fett-Eiweiß-Quotient größer 1,5 kein sicheres Merkmal für Stoffwechselstörungen ist (MAHLKOW-NERGE 2009). Deshalb besteht nach wie vor eine wichtige Aufgabe darin, ein geeignetes Maß zur Einschätzung der Energiehomöostase eines Tieres zu finden, um damit einen frühzeitigen Hinweis auf eine Stoffwechselstörung zu erhalten. Informationen über Gene, die die MilChfettmenge regulieren, könnten dazu einen Beitrag leisten.

Tab. 1 Zusammensetzung der Milch

Fett %	Protein %	Laktose %	Referenz
3,7 (3,5–5,5)	3,4	4,6	JENSEN 1995
2,0–7,0	2,5–6,0	3,5–5,5	SCHLIMME und BUCHHEIM 1999

Gene, die einen Einfluss auf die mit der Milch abgegebene Fettmenge haben, können auch eine grundsätzliche Rolle in der Regulation des Energiehaushalts spielen. Sie können direkt am Stoffwechsel beteiligt sein, zur Bildung und Mobilisierung von Körperfettdepots beitragen, die Energieaufnahme steuern oder zur Thermogenese führen. Diese Gene entfalten ihre Wirkung nicht nur im Zielorgan, dem Euter, sondern auch zentral in verschiedenen Hirnarealen und deren peripheren Erfolgsorganen. Eine zentrale Rolle spielt dabei der Hypothalamus mit dem *Nucleus arcuatus*, von dem periphere Signale in POMC- und NPY-Neurone aufgenommen, weitergeleitet und im Paraventriculären Nukleus reflektiert werden, um systemische Reaktionen in peripheren Organen auszulösen (ELMQUIST und FLIER 2004). Diese führen zur Verstärkung oder Reduktion des Fressens selbst, der Mobilisierung der Körperenergiereerven und der Regulation von Stoffwechselprozessen einschließlich der Thermoregulation.

Die Laktation ist ein Ergebnis der Evolution der Säugetierspezies. Sie ist essentiell für die Reproduktion der Art. Entsprechend phylogenetischer Untersuchungen zur Verwandtschaft existierender Säugetierspezies haben Rind und Mensch einen gemeinsamen Vorfahren vor etwa 98,9 Millionen Jahren (LEMAÏ et al. 2009). Aus der Rolle der Laktation für die Säugetiere kann man ableiten, dass die Mechanismen zur Synthese der Milch und ihrer Inhaltsstoffe sowie zur Regulation der Energiehomöostase während der Laktation konserviert sind. Des-

halb wäre zu erwarten, dass Gene, die z. B. den Fettansatz beim Menschen regulieren, auch die Milchfettmenge beim Rind beeinflussen könnten. Ein Homologievergleich von Kandidatengen auf DNA- und insbesondere Proteinebene kann also einen Hinweis auf die Rolle eines Genes für bestimmte Stoffwechsel- oder Regulationsfunktionen geben.

Beim Menschen wurden umfangreiche genomweite Assoziationsstudien in verschiedenen Populationen durchgeführt, um Gene zu finden, die zur Fettleibigkeit beitragen (LINDGREN et al. 2009, SCHERAG et al., THORLEIFSSON et al. 2009, WILLER et al. 2009). Die Gene MC4R (Melanocortin-4-Rezeptor) (GELLER et al. 2004, LOOS et al. 2008), INSIG2 (*Insulin-induced Gene-2*) (HEID et al. 2009, LYON et al. 2007) und FTO (*Fat mass and obesity associated gene*) (DINA et al. 2007, FRAYLING et al. 2007, HINNEY et al. 2007) haben in verschiedenen Studien wiederholt einen Einfluss auf die Körpermasse gezeigt und gelten daher als Gene, die sicher den Fettansatz beeinflussen. Die I103-Variante vom MC4R-Gen führt z. B. zu einer Reduktion des *Body-Mass-Indexes* um $0,5 \text{ kg/m}^2$, sowohl bei Jugendlichen als auch bei älteren Menschen. Varianten im INSIG2-Gen führen zur Veränderung des *Body-Mass-Indexes* um $0,8 \text{ kg/m}^2$. Das sind sehr geringe Effekte, gemessen an der Gewichts Differenz zwischen normal- und übergewichtigen Menschen.

3. Die genetische Architektur komplexer Merkmale

Dreiundzwanzig humane Gene werden zurzeit als Kandidatengene für den Fettansatz diskutiert. Neben dem oben erwähnten FTO-Gen befindet sich darunter auch das BDNF-Gen (*brain-derived neurotrophic factor*) (THORLEIFSSON et al. 2009). Die Zahl der neu identifizierten humanen Gene mit einem Einfluss auf den Fettansatz steigt weiter. Die Effekte der gefundenen Gene auf den Fettansatz, beim Menschen meist gemessen als *Body-Mass-Index*, sind sehr klein. Das widerspiegelt sehr gut den polygenen und komplexen Charakter der genetischen Determination dieses Merkmals, obwohl eine hohe Heritabilität vorliegt (MANOLIO et al. 2009). Ähnliche Beobachtungen werden z. B. auch für die Milchmenge und -zusammensetzung gemacht. DGAT1 als das am besten untersuchte Gen für dieses Merkmalsspektrum ist beim Rind ein Hauptgen und erklärt nur etwa 10 % der genetischen Varianz in einer Population. Alle weiteren Gene haben geringere Effekte auf die Merkmalsvarianz. Diese Komposition der Komplexität liegt für die meisten züchterisch relevanten Merkmale vor.

Die Variabilität eines Merkmals in der Population wird durch die genetische Architektur, durch die das Merkmal determiniert ist und die in Wechselwirkung mit der Umwelt steht, bestimmt (HILL et al. 2008). Die genetische Architektur solcher komplexer Merkmale wird vor allem durch vier Faktoren bestimmt:

- die Anzahl der Allele, die zum Merkmal beitragen (das können auch mehrere an einem Genort sein);
- die Frequenzen der einzelnen Allele in der Population (die selten oder häufig vorkommen können);
- die Effektgröße der einzelnen Allele (und möglicherweise deren Penetranz) sowie
- die Art und Weise des Zusammenwirkens der Allele (additiv oder in Wechselwirkung).

Während die zwei Allele eines SNPs nur zwei Gruppen von allelischen Effekten definieren können und damit drei Genotypengruppen möglich sind, erlauben die in der Regel mehr als zwei Haplotypen in einem Haplotypenblock einen differenzierteren Blick auf die untersuchte

Population. Es können mehrere alternative Allele an diesem Ort unterschiedliche Phänotypen determinieren. Damit ist ein weitaus differenzierterer Satz an Genotypengruppen möglich.

Haplotypenblöcke können als genomische Regionen betrachtet werden, in denen die SNPs in einem sehr hohen Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) stehen. Solche Regionen werden meist auf Grund geringer Rekombinationsraten gemeinsam vererbt. Die Länge eines Haplotypenblocks wird durch die Häufigkeit von Rekombinationen zwischen benachbarten SNPs bestimmt. Bei der Bestimmung von Haplotypenblöcken wird meist die Stärke des Kopplungsungleichgewichts zwischen zwei benachbarten SNPs (paarweises LD) mittels des normalisierten Maßes für allelische Assoziationen D' oder r^2 bestimmt (LEWONTIN und KOJIMA 1960, HILL und ROBERTSON 1968). D' beruht auf der Schätzung von Verbundwahrscheinlichkeiten für das Auftreten der Allelkombinationen an den zwei untersuchten Loci. Ein Wert von $D' = 1$ bezeichnet die perfekte Korrelation der Allele zwischen den beiden untersuchten SNPs. Für die Zusammenfassung von SNPs zu Haplotypenblöcken wird jedoch nicht unbedingt perfekte Assoziation gefordert. Kleine Abweichungen im SNP-Muster können zugelassen werden. Im Allgemeinen kann man folgenden Zusammenhang erwarten: Je strenger die Vorgabe an D' ist (je näher an 1), desto öfter werden zwei benachbarte SNPs zwei verschiedenen Blöcken zugeordnet. Die Folge davon ist eine größere Anzahl kürzerer Blöcke (SCHMITT und BROCKMANN 2007). Werden dagegen die Schwellenwerte auf geringere Werte von D' oder r^2 gesetzt, resultieren daraus weniger, aber längere Blöcke.

Unter Haplotyp wird die Serie benachbarter DNA-Varianten auf einem Chromosom verstanden, die gemeinsam vererbt wird. Diplotypen sind entsprechend Kombinationen zweier Haplotypen auf homologen Chromosomen. Die Anzahl der Allele steigt mit der Anzahl der SNPs in einem Haplotypenblock. Die Anzahl möglicher Haplotypen (n_{theoHT}) errechnet sich theoretisch aus der Anzahl der SNPs (n_{SNP}), die zum Haplotypenblock beitragen

$$n_{\text{theoHT}} = 2^{n_{\text{SNP}}}. \quad [1]$$

Die Anzahl der tatsächlich auftretenden Haplotypen (Kombinationen von Allelen auf einem DNA-Strang) hängt jedoch davon ab, zu welchen Zeitpunkten in der Evolution die Mutationen entstanden sind und Verbreitung gefunden haben. Die Anzahl der möglichen Diplotypen (n_{DT}) errechnet sich aus der Anzahl beobachteter Haplotypen (n_{obsHT}) über die Formel

$$n_{\text{DT}} = n_{\text{obsHT}}(n_{\text{obsHT}} + 1)/2. \quad [2]$$

In Assoziationsstudien wird üblicherweise für jeden SNP ermittelt, ob die zwischen verschiedenen Individuen vorhandenen Allele mit einem Phänotyp korrelieren. Ist der Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp statistisch signifikant, kann das Gen, aus dem der SNP stammt, oder das zumindest in der Nähe des SNPs liegt, als Kandidatengen für weitergehende Untersuchungen betrachtet werden. Wenn nicht eingehend bekannt ist, dass der SNP ursächlich das Merkmal verändert, wird davon ausgegangen, dass der SNP in einem engen Kopplungsungleichgewicht mit dem ursächlichen SNP steht.

Für die Durchführung von Assoziationsstudien auf der Grundlage von Haplotypenblöcken gibt es zwei wesentliche Vorteile gegenüber den Tests von einzelnen SNPs. Da Haplotypenblöcke aus zwei oder mehreren SNPs bestehen, kann die Anzahl der auszuführenden statistischen Tests reduziert werden. Dadurch kann das Problem des multiplen Testens, das

bei massenweisem Testen einzelner SNPs für die Berechnung der statistischen Signifikanzen entsteht, drastisch reduziert werden. Außerdem wird durch die verschiedenen Haplotypen, die einen Haplotypenblock bilden, die genomische Struktur der untersuchten Population deutlich, die selbst in der Assoziationsanalyse berücksichtigt werden sollte.

Die meisten Effekte identifizierter DNA-Varianten, die signifikant mit einem komplexen Merkmal assoziiert sind und in genomweiten Studien gefunden wurden, sind klein. Das DGAT1-Gen, das etwa 10 % der phänotypischen Varianz der Milchezusammensetzung und -menge in Holstein-Populationen erklärt, kann als Hauptgen betrachtet werden. Weitere Gene leisten nur einen geringen Beitrag (SCHOPEN et al. 2009, SCHENNINK et al. 2009). In humanen Studien lagen die meisten Genotypeneffekte bei geringen Odd-Ratios zwischen 0 und 1 (<http://www.genome.gov/gwastudies>). Für eine Reihe von 97 verschiedenartigen Merkmalen, die in sechs Kategorien eingeteilt wurden (Verhalten, Hämatologie, Stoffwechsel, Biochemie, Immunologie, Plethysmografie), wurden in heterogenen Mauspopulationen Geneffekte zwischen 3 und 5 % geschätzt (VALDAR et al. 2006). Des Weiteren wurden in mehr als 250 *Knockout*-Mäusen erwartete abnormale Phänotypen nur zu einem sehr geringen Prozentanteil gefunden (<http://www.informatics.jax.org/external/ko>). Sie betrugen 17 % für *Open-Field*-Aktivität, 10 % für den Cholesterinspiegel, für viele weitere Merkmale lagen sie jedoch unter 10 % (FLINT und MACKAY 2009).

Das spezifische Zusammenwirken der DNA-Varianten innerhalb eines Haplotypen auf einem Chromosom kann jedoch zur Bildung von „Superallelen“ führen, die einen stärker ausgeprägten Phänotyp besitzen als ein Allel an einem einzelnen SNP-Lokus (ZIEGLER und KÖNIG 2006). Das Auffinden von Allelen, die an der Ausführung eines Merkmals beteiligt sind, hängt neben dem Alleleffekt von der Allelfrequenz des Allels ab, das maßgeblich vom durchschnittlichen Alleleffekt in der Population abweicht. Für seltene Allelvarianten sind Haplotypenstudien effizienter als direkte SNP-Analysen. Sie können aber die Stärke zum Nachweis von Assoziationen reduzieren (SCHAID 2004).

4. Testung von Kandidatengeneffekten auf die Milchfettmenge beim Rind

4.1 Auswahl der Gene

Humane Adipositas-assoziierte Kandidatengene wurden genutzt, um zu untersuchen, ob diese Gene beim Rind einen Einfluss auf die erzeugte Fettmenge eines Individuums haben, wobei die von der Kuh erzeugte Milchfettmenge als Merkmal analysiert wurde. Fünfzehn der zurzeit 23 publizierten humanen Gene haben eine Proteinidentität von mehr als 80 % zwischen Mensch und Rind (FREDRIKSSON et al. 2008). Sie können damit als evolutionär hochkonserviert auf der Proteinebene eingestuft werden. Solche Gene gelten als besonders gute Kandidaten für spezieübergreifende Untersuchungen, da vermutet werden kann, dass die Funktion dieser Genprodukte ähnlich ist.

Im Nachfolgenden stellen wir beispielhaft Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der beiden humanen Kandidatengene BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) und FTO (*Fat mass and obesity associated*) auf die Milchfettmenge in der 1. bis 3. Laktation beim Rind dar. Zur besseren Veranschaulichung der erhaltenen Ergebnisse beziehen wir DGAT1 (*Diacylglycerol-O-acyltransferase 1*) als das am besten untersuchte ursächliche Gen für unterschiedlichen Milchfettgehalt beim Rind in die Untersuchungen ein.

4.2 Untersuchte Tierpopulation, Genotypen, Phänotypen

4.2.1 Bullenpopulation

Genotypendaten. In die Untersuchungen wurden 2402 Zuchtbullen der Rasse Deutsche Holstein-Friesian einbezogen. Als genetische Marker lagen Genotypen von 54 001 SNPs des Illumina-BovineSNP50-Beadchips vor. Von den 2402 Bullen wurden 48 wegen geringer Genotypisierungseffizienz (>10 % fehlende SNP-Daten) ausselektiert. Insgesamt wurden 8748 SNPs aus den Untersuchungen entfernt, weil Genotypisierungen in mehr als 10 % der Tiere fehlten (749 SNPs) oder weil die Allelfrequenz des Minderheitenallels unter 1 % (7998 SNPs) lag.

Phänotypendaten. Von allen genotypisierten Bullen lagen die Originalzuchtwerte (OZW) für die Milchproduktionsmerkmale (Milchmenge [MY], Proteingehalt [P%], Proteinmenge [PY], Fettgehalt [F%] und Fettmenge [FY]) vor. Die Zuchtwerte wurden von der VIT GmbH (Verden, Deutschland) im August 2009 bezogen. Zuchtwerte waren für die Laktationen 1 bis 3 und für den Durchschnitt aller 3 Laktationen vorhanden. Den nachfolgenden Ergebnissen liegen die Zuchtwerte für die durchschnittlichen Milchfettmengen von der 1. bis zur 3. Laktation zugrunde.

4.2.2 Kuhpopulation

Genotypendaten. Für Validierungsstudien signifikanter Effekte aus der Bullenpopulation in genomischen Zielregionen wurden 1467 Holstein-Friesian-Kühe untersucht, die in drei verschiedenen Herden gehalten wurden. Diese Kuhpopulation wurde an den signifikantesten SNPs der bei den Bullen identifizierten Genomregionen analysiert.

Phänotypendaten. Für die Bewertung der Kühe wurden die Eigenleistungsdaten verwendet. Um die Leistungen der Kühe zu normalisieren, wurden die sogenannten *Yield Deviations* (normalisierte Abweichungen vom Populationsmittel [μ]) für die Fettmenge (Fett-kg) berechnet. Im Modell wurden die Effekte der Herde (H_i), der Interaktion zwischen Herde und Kalbesaison ($H_i \times C_j$) und des Erstkalbealters (F_k) berücksichtigt. Das Modell unter der Nutzung des beschränkten *Maximum-Likelihood*-Verfahrens (REML) wird mit folgender Gleichung beschrieben:

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + H_i * C_j + F_k + \varepsilon_{ijk}, \quad [3]$$

4.3 Generierung von Haplotypen

Haplotypen wurden unter Verwendung der Software FASTPHASE (SCHEET und STEPHENS 2006) generiert. Dafür wurden strengere Filterkriterien verwendet als für die Genotypisierung. Unter Ausschluss von Individuen mit mehr als 3 % fehlenden Genotypen waren 2978 Bullen für die Haplotypisierung verfügbar. SNPs mit einer Häufigkeit des Minderheitenallels von weniger als 5 % und mehr als 5 % fehlender *Calls* sowie SNPs mit unbekannter genomischer Lokalisation (SCHMITT et al. 2010) wurden nicht berücksichtigt. Das Programm wurde mit zehn Zufallsstarts des EM-Algorithmus und jeweils 25 Iterationen verwendet.

Genotypendaten mit Haplotypenphasen wurden eingeteilt in Haplotypenblöcke unter Verwendung des *Solid-Spine*-Algorithmus, der in der Software HaploView (BARRETT et al. 2005) implementiert ist. Als Block wurden alle Marker betrachtet, die innerhalb einer Region mit

einem Kopplungsungleichgewicht von $D' > 0,8$ lagen, wobei Kopplungsungleichgewichte für einen maximalen Markerabstand von 500 kb berechnet wurden.

4.4 Assoziationsanalysen

Die Assoziationen zwischen SNPs und dem Milchfettgehalt wurden unter Verwendung der Software PLINK (PURCELL et al. 2007) untersucht. Der SNP, der am nächsten am Kandidatengen liegt, wurde als Zentrum einer Kandidatengenregion definiert. Alle SNPs innerhalb einer 1 Mb-Region *up-* und *downstream* dieses im Zentrum einer Kandidatengenregion liegenden SNPs wurden für Assoziationsuntersuchungen genutzt. Mit einem linearen Regressionsmodell wurden zunächst die Effekte der Genotypen an einem SNP-Lokus geschätzt. Da der Einfluss des DGAT1-Gens auf den Milchfettgehalt gut bekannt ist, wurde der signifikanteste DGAT1-SNP in das Modell einbezogen, mit dem weitere Kandidatengene hinsichtlich der Assoziation zu Merkmalen untersucht wurden.

In der Population wurden ferner Subpopulationsstrukturen untersucht. In der Bullenpopulation wurden 40 Vollgeschwistergruppen identifiziert. Um die Populationssubstruktur in der Assoziationsanalyse zu berücksichtigen, wurden paarweise Populationskonkordanztests (PPC) unter Verwendung einer *Identity-by-State*-ähnlichen Matrix in PLINK durchgeführt. Dabei wurden 124 signifikante Cluster identifiziert ($p < 10^{-4}$). Unter Verwendung des multidimensionalen Scaling (MDS)-Ansatzes wurden diese 124 Cluster im Modell gefittet.

Bei der Bewertung der Ergebnisse der Assoziationsanalysen wurde das multiple Testen berücksichtigt. Dafür wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. SNP-Genotypen, die unter Berücksichtigung des multiplen Testens signifikante Assoziationseffekte gezeigt haben, wurden unter Verwendung von ANOVA und nachfolgendem Tukey-HSD-Test geprüft, um nachzuweisen, welche der Genotypenklassen sich signifikant unterscheiden.

Haplotypenassoziationsanalysen wurden innerhalb der 2 Mb-Kandidatenregionen durchgeführt. Alle Haplotypen mit Frequenzen $> 1\%$ in der Population wurden in die Assoziationsanalysen einbezogen. In der Assoziationsanalyse mit den Haplotypen wurden die gleichen Faktoren berücksichtigt wie in den Assoziationsanalysen mit den SNPs. Für die Generierung von Haplotypeneffektplots wurden die Haplotypenphasen, die über FASTPHASE erhalten wurden, verwendet. Um Haplotypeneffekte hinsichtlich ihrer Signifikanz zu testen, wurde ein lineares Modell genutzt. Der Tukey-HSD-Test wurde angewendet, um paarweise Unterschiede zwischen den Haplotypengruppen nachzuweisen.

5. Ergebnisse der Testung von Kandidatengenen auf die Milchfettmenge beim Rind

5.1 DGAT1 (*Diacylglycerol-O-acyltransferase 1*)

DGAT1 (*Diacylglycerol-O-acyltransferase 1*) ist das ratenlimitierende Enzym in der Synthese von Triacylglyceriden (CASES et al. 1998). Im bovinen Gen wurden zwei Polymorphismen gefunden, die mit der Milchmenge und der -zusammensetzung stark assoziiert sind, eine nicht-synonyme Mutation im Exon 8, die einen Aminosäureaustausch von Lysin zu Alanin an Position 232 (K232A) verursacht (GRISART et al. 2002), und ein Variables Tandem-Repeat (VNTR) mit fünf Allelvarianten im Promotorbereich (BENNEWITZ et al. 2004). Dieses Gen wurde bislang beim Menschen nicht als fettleibigkeitsassoziiertes Gen nachgewiesen (SCHERAG et al. 2010).

In verschiedenen Rinderrassen steigert die Lysin-Variante den Fett- und Proteingehalt sowie die Fettmenge in der Milch (GRISART et al. 2002, RAHMATALLA et al. 2008, THALLER et al. 2003, WINTER et al. 2002). Die Alanin-Variante erhöht im Gegensatz dazu die Menge an Milch, Protein, C18-Fettsäure und konjugierter Linolsäure (GRISART et al. 2002, 2004, SCHENNINK et al. 2007, 2008, WINTER et al. 2002). Die Häufigkeiten der Lysin-Variante in der Holstein-Population bewegt sich international zwischen 30–65 % (BOVENHUIS und SCHROOTEN 2002, GRISART et al. 2002, WINTER et al. 2002). Unter fünf gefundenen VNTR-Allelen im Promotorbereich zeigt ein Allel besonders starke Assoziation mit Fettgehalt, aber auch mit Laktosegehalt und -menge sowie Energiegehalt und somatischem Zellgehalt im Vergleich zu den anderen Allelen (KÜHN et al. 2004, SANDERS et al. 2006).

In weiteren Assoziationsstudien wurden die Effekte der Haplotypen unter Berücksichtigung des K232A-Polymorphismus und der fünf VNTR-Allele untersucht. Ein Regulationsmechanismus zwischen dem DGAT1-Aminosäureaustausch und der gekoppelten Promotorvariante für Fettmenge und -gehalt wurde vermutet, da der signifikant positive Effekte der beiden häufigsten Allele beider Polymorphismen geringer war, wenn sie zusammen in einem Haplotypen auftraten (SANDERS et al. 2006). Signifikante Dominanzeffekte des Lysin-Allels (einzeln und in Kombination mit dem VNTR) ebenso wie für die Allele 1 und 5 des VNTR-Polymorphismus auf den Milchfettgehalt wurden bislang nur von KÜHN et al. (2004) nachgewiesen. Andere Ergebnisse, nach denen keines der Allele des VNTR-Polymorphismus, korrigiert für den K232A-Polymorphismus, signifikant mit Fettgehalt assoziiert war, lassen den Schluss zu, dass wahrscheinlich noch ein weiterer bisher nicht identifizierter kausaler Polymorphismus im DGAT1-Gen oder in unmittelbarer Nachbarschaft existiert.

Weder der SNP, der dem K232A-Polymorphismus unterliegt, noch der VNTR sind auf dem BovineSNP50-Beadchip präsent. Der K232A-Polymorphismus (Chromosom 14, 445086 bp, Btau 4.0) befindet sich 1150 bp 3' zu dem Chip-annotierten SNP ARS-BFGL-NGS-4939 (443937 bp). Die Position des VNTR-Lokus kann wegen der variablen Struktur auf dem gegenwärtigen Stand der bovinen Genomsequenz (Btau 4.0) nicht exakt bestimmt werden, liegt jedoch zwischen den Markern ARS-BFGL-BAC-21276 (437973 bp) und ARS-BFGL-NGS-4939 (443937 bp). Assoziationsanalysen mit den auf dem Chip vorhandenen SNPs in der Bullenpopulation zeigten, dass innerhalb der 1,2Mb-Region um das DGAT1-Gen alle SNPs hochsignifikant assoziiert waren (Abb. 1A). Für den signifikantesten SNP ($p = 1,761 \times 10^{-68}$) am DGAT1-Lokus wurden bei den Bullen drei Genotypenklassen gefunden, die durchschnittliche Originalzuchtwerte für die Fettmenge von $13,04 \pm 0,68$ (AA), $25,21 \pm 0,72$ (AG) und $36,53 \pm 1,47$ (GG) kg von der 1. bis zur 3. Laktation aufwiesen. Das Vererbungsmuster entspricht damit vollständig einem klassischen additiven Erbgang. Genotypen mit dem höchsten Mittelwert treten mit der geringsten Frequenz auf (0,10). Der Genotyp mit dem höchsten Mittelwert entspricht weitgehend dem K232-Allel (Lysin-Variante) im DGAT1-Enzym. Für den Aminosäureaustausch im DGAT1-Enzym in der Position 232 zeigen Untersuchungen an Milchkühen ebenfalls dieses additive Vererbungsmuster.

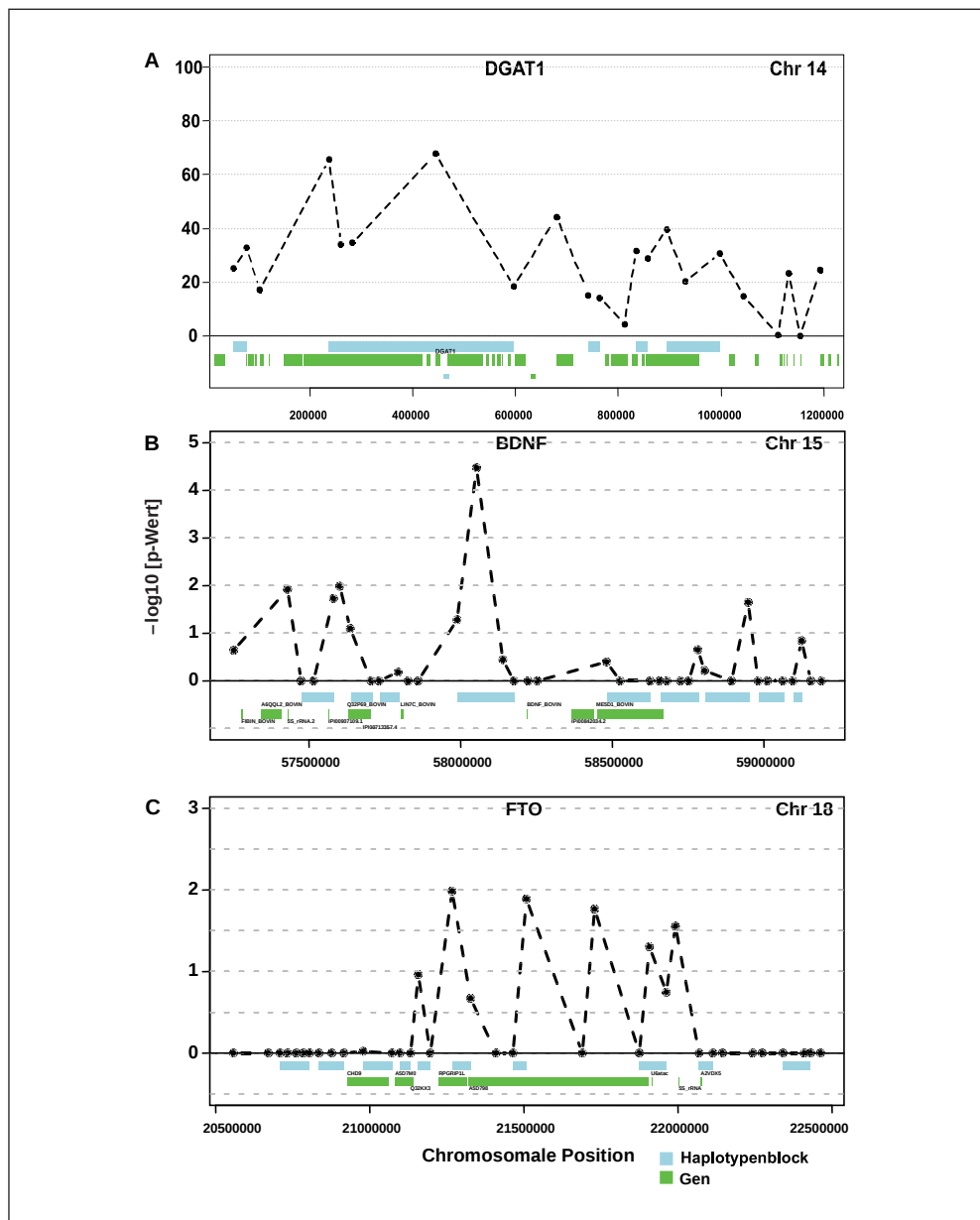


Abb. 1 Genomische Struktur um das DGAT1- (A), BDNF- (B) und FTO-Gen (C). Die Region um DGAT1 ist 1,2 Mb groß, die Regionen um BDNF und FTO jeweils 2 Mb. Die schwarzen Punkte zeigen die Lage der SNPs in der gesamten Region und die p-Werte aus der Assoziationsanalyse. Die horizontalen blauen Balken zeigen die Lage von Haplotypenblöcken, die grünen Balken die Position von Genen im Bereich der Kandidatengene.

Der Haplotypenblock, in dem dieser signifikanteste SNP liegt, wird aus fünf SNPs im hohen Kopplungsungleichgewicht von $D' > 0,94$ gebildet (Abb. 2). Vier Haplotypen treten mit Häu-

figkeiten $>1\%$ in der Bullenpopulation auf. Der Haplotyp mit dem größten Effekt ($28,28 \pm 0,62$ kg) unterscheidet sich hochsignifikant von den drei anderen Haplotypen ($p < 0,0001$). Außerdem unterscheiden sich die Haplotypen AAAAG und AAAAA ($p < 0,0001$). Der Haplotyp AGCAA liegt im Effekt zwischen AAAAA und AAAAG und ist weder von AAAAA noch von AAAAG signifikant verschieden. Die Unterscheidung von mindestens drei Haplotypen ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von mindestens drei funktionell verschiedenen Allelen im Haplotypenblock, die zu den unterschiedlichen Phänotypen beitragen.

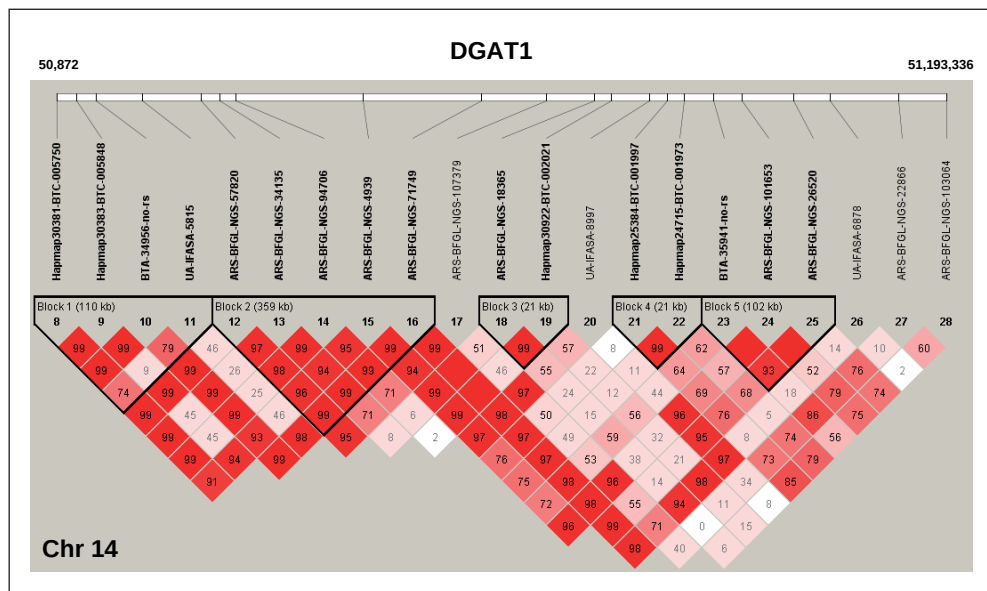


Abb. 2 Exemplarische Haplotypenblockstruktur für das DGAT1-Gen über einen Bereich von 600 000 bp. Die Haplotypenblockstruktur wurde mit dem Programm HAPLOVIEW erzeugt. Rote Quadrate repräsentieren Regionen mit hohem Kopplungsungleichgewicht ($D' > 0,8$). Im untersuchten Bereich wurden fünf Haplotypenblöcke unterschiedlicher Größe gefunden. Block 2 ist der längste Block, bestehend aus fünf SNPs, mit dem höchsten Kopplungsungleichgewicht zwischen den benachbarten SNPs.

Die Kombinationen der Haplotypen in Diplotypen zeigen ebenfalls den additiven Erbgang in allen auftretenden Kombinationen von Haplotypen. Damit wird der additive Erbgang für alle Allele (Haplotypen) des DGAT1-Lokus mit Einfluss auf die produzierte Milchfettmenge untermauert.

Die Varianzanteile in der Population, die durch die fünf SNPs in Haplotypenblock einzeln erklärt werden, beträgt 11,7 %. Die Diplotypen hingegen erklären 12,5 % der Varianzanteile und damit 7,3 Prozentpunkte mehr als alle einzelnen SNPs im Haplotypenblock.

5.2 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)

BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) ist ein im Gehirn vorkommender Nervenwachstumsfaktor, der seit langem für seine Rolle in der neuronalen Differenzierung bekannt ist (BINDER und SCHARFMAN 2004). Dieses Gen wurde in genomweiten Assoziationsstudien

beim Menschen mit der Vererbung des *Body-Mass-Indexes* in Verbindung gebracht. In einer Studie mit gesunden Erwachsenen konnten signifikante Assoziationen zwischen dem V66M-Polymorphismus im BDNF und dem *Body-Mass-Index* nachgewiesen werden. Homozygote Methionin-Träger hatten geringere *Body-Mass-Indizes* (GUNSTAD et al. 2006). In einer weiteren genomweiten Studie zeigten sechs SNPs downstream vom BDNF-Gen ebenfalls signifikante Assoziationen zum *Body-Mass-Index* (THORLEIFSSON et al. 2009).

Die Funktion des BDNF in der Gewichtsregulation ist nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich entfaltet BDNF seine Wirkung auf die Körpermasseregulation im zentralen Nervensystem. In Untersuchungen mit neuronalen Zellen konnte gezeigt werden, dass BDNF die synaptische Plastizität verändert (SOLIMAN et al. 2010). Bekannt ist, dass Mutationen die Gedächtnisleistung verändern und das Angstverhalten beeinflussen. Es wird vermutet, dass ein höherer Level an BDNF zu verminderter Nahrungsaufnahme und erhöhter physischer Aktivität führt (MONTELEONE et al. 2005).

In unserer Studie (ZIELKE et al. 2011) wurden auf dem BovineSNP50-Beadchip auf Chromosom 15 in der 2Mb-Region um das BDNF-Gen 36 genotypisierte SNPs gefunden. In den Assoziationsstudien in der Bullenpopulation wurden fünf SNPs mit signifikanten Effekten auf die mittlere Milchfettmenge in den ersten drei Laktationen nachgewiesen (Abb. 1B). Die Zuchtwerte für die beiden homozygoten Genotypen an dem signifikantesten SNP ($p < 0,0001$) unterschieden sich um 10 Einheiten, die heterozygoten Tiere lagen genau in der Mitte. Der Genotyp mit der geringsten Fettmenge war mit der geringsten Genotypfrequenz (6%) in der Bullenpopulation vertreten. Die genetischen Effekte der mit diesem SNP gekoppelten Allelvarianten folgten damit dem additiven Erbgang. Dieser additive Erbgang wurde auch in der Kuhpopulation bestätigt.

Der Haplotypenblock, in dem auch der signifikanteste SNP liegt, wird durch vier SNPs über eine Distanz von 187 kb gebildet. Dieser Haplotypenblock ist in der 2Mb-Region um BDNF am signifikantesten mit dem Zuchtwert für Milchfettmenge assoziiert ($p < 0,0001$). Die SNPs im Haplotypenblock stehen in einem hohen Kopplungsungleichgewicht von $D' > 0,95$. Die genetischen Effekte dieser vier SNPs sind verschieden. Zwei dieser SNPs, die im 5'-Bereich der 2Mb-Region liegen, sind signifikant mit der Milchfettmenge assoziiert, wenn sie einzeln untersucht werden. Die Alleleffekte sind additiv. Die beiden anderen SNPs im 3' gelegenen Bereich der Zielregion sind nicht signifikant mit der Milchfettmenge assoziiert, wenn sie einzeln untersucht werden. Die Allele dieser SNPs zeigen einen dominanten Erbgang für das Hochfett-Allel.

Im Haplotypenblock wurden fünf Haplotypen mit einer Frequenz $> 1\%$ in der Bullenpopulation gefunden. Die Haplotypeneffekte dieser fünf Haplotypen konnten drei Effektgruppen zugeordnet werden ($p < 0,001$). Die Zuchtwerte für die durchschnittliche Milchfettmenge der 1. bis 3. Laktation unterschieden sich zwischen den drei Gruppen drastisch ($p < 0,001$), aber nicht innerhalb der Gruppen (Abb. 3A). Das ist ein sicherer Hinweis darauf, dass neben dem Wildtyp-Allel mindestens zwei Mutationen für den Effekt der BDNF-Region auf die Fettmenge verantwortlich sein müssen. Die Haplotypen mit den mittleren Effekten treten am häufigsten in der Population auf. Die Kombination der Haplotypen zu Diplotypen zeigt ein komplexes Muster. Es treten sowohl additive, rezessive als auch dominante genetische Effekte auf, die abhängig von der Beteiligung bestimmter Allele sind (Abb. 3B). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Wirksamkeit eines Allels nicht nur von der Primärsequenz im Haplotypen abhängig ist, sondern darüber hinaus von der Wechselwirkung mit dem homologen Allel geprägt wird.

Am BDNF-Lokus erklären die vier SNPs, die den Haplotypenblock bilden, einzeln 2,0% der Varianz in der Population. Die Diplotypen erklären 2,2%. Damit erklären die Diplotypen 10,6 Prozentpunkte mehr Varianz, als alle einzelnen SNPs im Haplotypenblock zusammen.

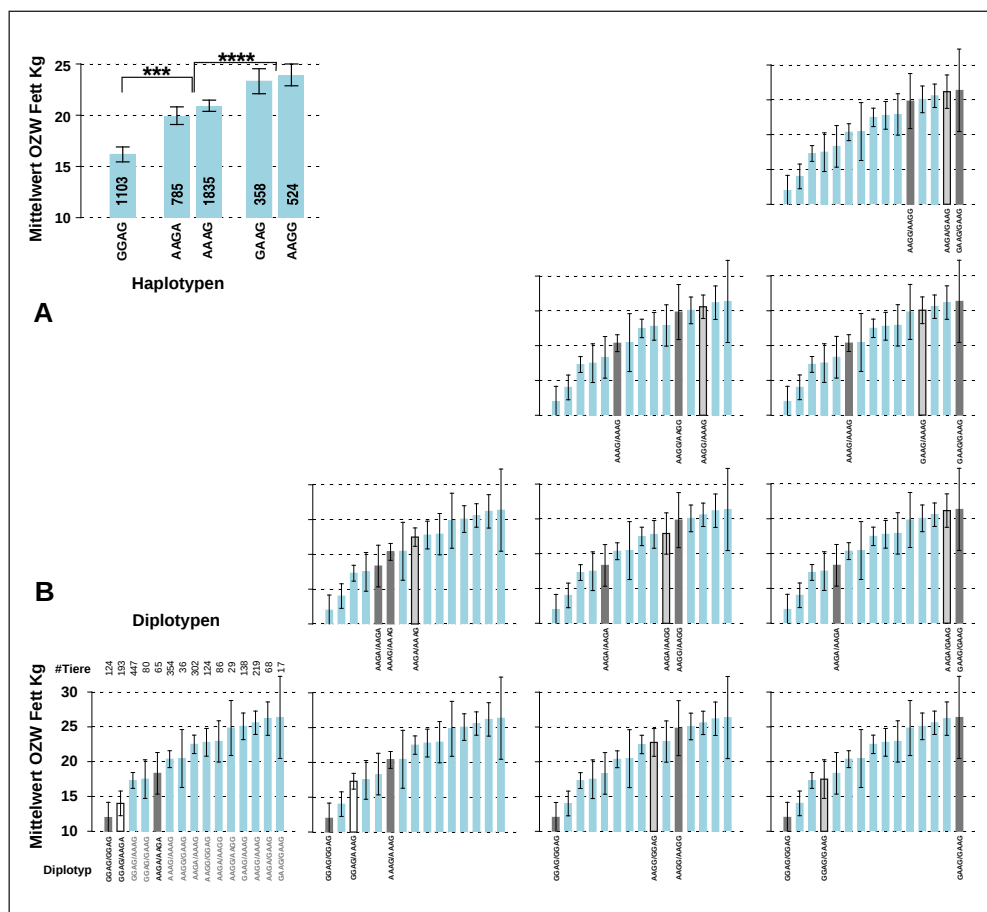


Abb. 3 Haplotypen- (A) und Diplotypeneffekte (B) auf den Originalzuchtwerf für die durchschnittliche Fettmenge in der 1. bis 3. Laktation in der Bullenpopulation am BDNF-Lokus. Die Diplotypeneffektplots zeigen jeweils alle auftretenden Kombinationen von Haplotypen in der Bullenpopulation; je zwei homozygote (grau) und der korrespondierende heterozygote Diplotyp (weiß) sind farblich markiert.

Eine Prüfung der Rolle dieser BDNF-Region auf andere Merkmale hat gezeigt, dass neben der produzierten Fettmenge auch die durchschnittliche Milch- ($p = 0,0001$) und Eiweißmenge ($p = 0,0093$) in der 1. bis 3. Laktation sowie der somatische Zell-Score (SCS) in der 1. ($p = 0,0199$) und 3. Laktation ($p = 0,0209$) beeinflusst werden.

Die Ergebnisse, die in der Bullenpopulation erhalten wurden, konnten in der Kuhpopulation bestätigt werden. Die Allelfrequenzen am signifikantesten SNP-Lokus sind in beiden Populationen ähnlich.

5.3 FTO (Fat mass and obesity associated gene)

FTO (Fat mass and obesity associated gene) ist ein Protein, das nach verschiedenen Experimenten und *In-silico*-Funktionsvorhersagen als Mitglied der Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-

abhängigen Oxygenase-Superfamilie identifiziert wurde (GERKEN et al. 2007). Das Protein signalisiert die zelluläre Sauerstoffverfügbarkeit, ist am Fettsäuremetabolismus beteiligt und katalysiert die oxydative Demethylierung von Nukleinsäuren (HAN et al. 2010). Daher hat es eine wichtige Funktion bei der DNA-Reparatur und posttranslationalen Modifikationen.

FTO ist zwischen Rind, Mensch, Maus und Pferd mit 80–90% Sequenzidentität auf DNA- und Proteinebene hoch konserviert (FREDRIKSSON et al. 2008). Deshalb wird erwartet, dass das Protein ähnliche Funktionen in den verschiedenen Spezies ausübt. Das zugrundeliegende fettmasse- und fettleibigkeitsassoziierte Gen FTO hat in genomweiten Assoziationsstudien beim Menschen wiederholt gezeigt, dass genetische Varianten mit einem signifikant erhöhten *Body-Mass-Index* assoziiert sind (DINA et al. 2007, FRAYLING et al. 2007). Eine Humanstudie schätzt den Anteil der erklärten Varianz durch den Adipositas-Risikogenotyp auf 2% (RANKINEN et al. 2010).

Untersuchungen in den Modellorganismen Maus und Ratte haben den Einfluss dieses Gens auf die Energiehomöostase und den -haushalt bestätigt (FISCHER et al. 2009, FREDRIKSSON et al. 2008). In einem *Knockout*-Modell wurde z. B. gezeigt, dass sich bei Mäusen ohne FTO-Protein ein postnataler Wachstumsrückgang einstellte, der mit einem signifikanten Rückgang des Fettgewebes und Magergewichts einherging (FISCHER et al. 2009). Es wird vermutet, dass die Regulierung des Körpergewichts durch Aktivität von FTO in Hirnregionen entsteht, welche die Nahrungsaufnahme steuern. Dies wird durch die Beobachtung unterschiedlicher mRNA-Expressionslevels in Abhängigkeit von Essen und Fasten belegt (FREDRIKSSON et al. 2008). Signifikant erhöhte Expressionen von FTO in Hirnregionen wie Cortex, Cerebellum und Hippocampus konnte auch in Schweinen (MADSEN et al. 2010) sowie im Hypothalamus von Schafen nachgewiesen werden (SEBERT et al. 2010). *Knockout*- (FISCHER et al. 2009), gewebespezifisch regulierte Mausmodelle (GERKEN et al. 2007, STRATIGOPOULOS et al. 2008) und Untersuchungen in Adipozyten-Zellkulturen (BARCELÓ-BATLLORI und GOMIS 2009) zeigen einen klaren Einfluss von FTO auf den Fettansatz und leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Funktion dieses Gens.

In der 2Mb-Region um das FTO-Gen auf Chromosom 18 liegen 36 SNPs, die auf dem BovineSNP50-Beadchip präsent sind. In dieser Region wurden in der Bullenpopulation fünf SNPs gefunden, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Genotypen und der Milchfettmenge haben (Abb. 1C). Der SNP, der am signifikantesten mit dem Originalzuchtwert für Milchfettmenge in der 1. bis zur 3. Laktation assoziiert ist ($p = 0,0103$), liegt in einem Haplotypenblock, der aus zwei SNPs besteht. Der zweite SNP in diesem Haplotypenblock zeigt in der Bullenpopulation selbst keinen signifikanten Einfluss auf die Originalzuchtwerte für die Milchfettmenge ($p = 0,2127$). Der Unterschied zwischen den beiden Homozygotengruppen beträgt am signifikantesten SNP-Lokus 3 Einheiten im Originalzuchtwert, wobei die Alleleffekte an beiden SNP-Loci additiv sind und Dominanzanteile tragen (Abb. 4). Die Allele mit den geringeren Frequenzen an beiden Loci in der Bullenpopulation erhöhen die Milchfettmengen. Der gesamte Haplotypenblock zeigt ebenfalls die signifikanteste Assoziation mit der Milchfettmenge ($p = 0,0053$). Der beschriebene Haplotypenblock beginnt mit dem ersten SNP in einem Abstand von 54 071 bp zur Startposition des 1. Exons und reicht mit dem zweiten SNP bis ins Intron 1 des FTO-Gens. Im FTO-Gen selbst liegt ein zweiter Haplotypenblock, der ebenfalls signifikant mit der Milchfettmenge assoziiert ist, jedoch geringere Signifikanzwerte aufweist ($p = 0,0116$) als der erste.

Die Effekte am FTO-Lokus wurden bei den Kühen für den zweiten SNP im signifikantesten Haplotypenblock getestet. Die Ergebnisse bestätigten einen signifikanten Effekt des

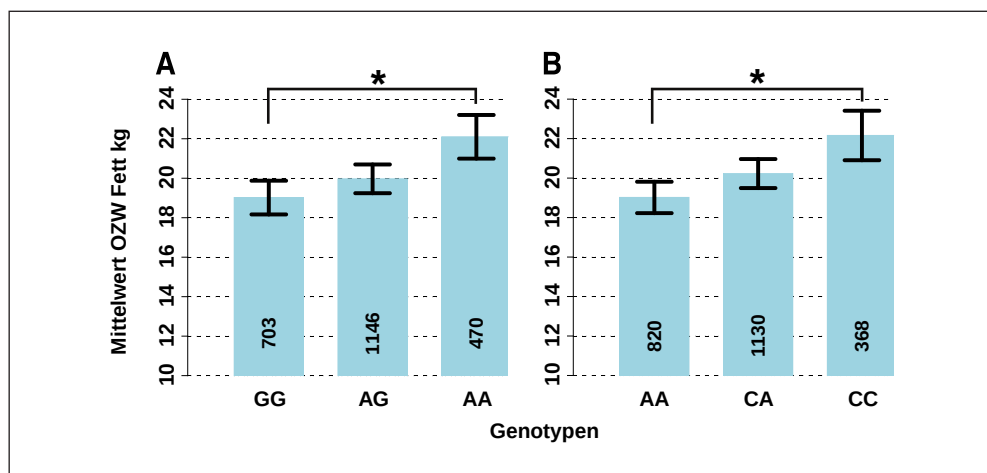


Abb. 4 Genotypeneffekte der SNPs im signifikanten Haplotypenblock in Nachbarschaft zum FTO-Gen für den Originalzuchtwert mittlere Fettmenge (1. bis 3. Laktation) in der Bullenpopulation; SNP *ARS-BFGL-NGS-41145* (A) und SNP *HAPMAP39651-BTA-42671* (B). * $p < 0,05$ approximativer T-Test.

FTO-Lokus auf die *Yield Deviation* der Fettmenge in der 1. bis 3. Laktation. Der Unterschied zwischen den homozygoten Genotypenklassen beträgt 12,2 kg Fett (*Yield Deviation*) ($p = 0,0043$). Die Richtung der Alleleffekte bei den Kühen stimmt mit den Ergebnissen bei den Bullen überein.

Die beiden SNPs im signifikantesten Haplotypenblock erklären zusammen 0,054 % der Varianz in der Population. Der signifikanteste SNP alleine erklärt 0,120 % der phänotypischen Varianz. Die Diplotypen erklären 0,125 % der Varianz und damit 6,6 Prozentpunkte mehr als die einzelnen SNPs.

Die FTO-Region hat ebenfalls Einfluss auf andere Merkmale. Der Einfluss auf den Originalzuchtwert für die durchschnittliche Milchmenge ($p = 0,0020$), die Eiweißmenge ($p = 0,0108$) und den somatischen Zellscore ($p = 0,0246$) in der 1. bis 3. Laktation sind in der Bullenpopulation signifikant.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Unter der Annahme, dass die an der Laktation beteiligten Prozesse und die Prozesse zur Regulation der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase zwischen Säugetieren konserviert sind, haben wir aus humanen genomweiten Assoziationsstudien Gene ausgewählt, die wiederholt einen Einfluss auf Adipositas beim Menschen gezeigt haben, um den Einfluss dieser Gene auf die Fettmenge der Milchkuh zu untersuchen. Die Untersuchungen wurden an ca. 2400 Bullen der Rasse Deutsche Holstein durchgeführt und die Ergebnisse an einer Population von ca. 1500 Milchkuh unter Produktionsbedingungen verifiziert.

Die Effekte der beiden untersuchten humanen Gene BDNF und FTO erklärten 2,20 und 0,125 % der Varianz im Originalzuchtwert für die durchschnittliche Fettmenge in der 1. bis 3. Laktation in der untersuchten Bullenpopulation. Die Ergebnisse konnten unter Praxisbedin-

gungen in der Kuhpopulation bei Verwendung der Eigenleistungsdaten bestätigt werden. Die bei den Bullen und bei den Kühen gefundenen Effekte sind für die untersuchten Gene ähnlich.

Die Validierung der Ergebnisse in der Kuhpopulation zeigt, dass der Kandidatengenansatz ein nach wie vor stringenter Weg zum Nachweis von genetischen Assoziationen ist. Der entscheidende Vorteil besteht darin, dass der Kandidatengenansatz multiples Testen reduziert und damit unter unseren experimentellen Bedingungen das Finden von Effekten bei p-Werten um $p = 0,001$ ermöglichte. Legt man diesen p-Wert zugrunde, gibt es über 150 weitere potentielle Loci im Genom, die möglicherweise den Fettgehalt beeinflussen. Damit ist auch auf genomischer Ebene bestätigt, dass die Genetik einen hohen Einfluss auf die produzierte Milchfettmenge hat. Die genetischen Effekte sind überwiegend additiv oder rezessiv/dominant. Das weist nicht nur darauf hin, dass tatsächlich viele Gene an der Regulation des Milchfettgehalts beteiligt sind, sondern auch darauf, dass die meisten Effekte sehr klein sind und damit dem infinitesimalen Modell der Vererbung komplexer Merkmale entsprechen (FLINT und MACKAY 2009, MANOLIO et al. 2009, VISSCHER 2008). Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass Gene, die den Fettansatz beim Menschen determinieren, auch eine Rolle für die mit der Milch produzierte Fettmenge spielen.

Vergleichende Untersuchungen der Effekte von SNP-Allelen und Haplotypen zeigen, dass Haplotypen bei allen untersuchten Genen einen genaueren Informationsgehalt besitzen als die einzelnen SNPs, die den Haplotypenblock bilden. Die wesentliche Ursache dafür besteht darin, dass Haplotypen die ursächlichen gekoppelten Mutationen genauer widerspiegeln als einzelne SNPs. Haplotypen können als „Superallele“ Interaktionen zwischen DNA-Elementen enthalten, die in Untersuchungen einzelner SNPs verborgen bleiben. Damit kennzeichnen Haplotypen die Art und Weise des phänotypischen Effekts genauer als einzelne SNPs. Die Berücksichtigung von Haplotypen oder besser noch Diplotypen, die auch die Interaktion zwischen den beiden homologen Haplotypen einschließen, kann somit zur Erhöhung der Genauigkeit in der genomischen Zuchtwertschätzung beitragen.

Um die Haplotypen möglichst genau zu erfassen, sind noch dichtere SNP-Chips nötig, mit denen auch kurze Haplotypenblöcke sicher identifiziert werden können. Um die ursächlichen Mutationen zu finden, die Einfluss auf die produzierte Fettmenge haben, ist die Sequenzanalyse der Zielregionen unumgänglich.

Die vorgestellten Untersuchungen haben gezeigt, dass Gene wie BDNF und FTO, die beim Menschen den Fettansatz beeinflussen, Einfluss auf die Milchfettmenge beim Rind haben. Die „Fettgene“ könnten über ihre Rolle für die Energiebalance auch zur Tiergesundheit und Reproduktion beitragen. Deshalb könnte möglicherweise das Netzwerk der „Fettgene“ eine umfassende Aussage zur genetischen Veranlagung der Stoffwechselleistung und -belastung sowie Reproduktion und Gesundheit eines Tieres geben. Damit könnte die Interpretation der genetischen Konstitution an den Loci der Fettgene das Tor für die zukünftige individualisierte Tierbeurteilung und -behandlung sein.

Dank

Die Untersuchungen an der Bullenpopulation wurden im Rahmen des FUGATO-Projekts GenoTrack durchgeführt (Kennzeichen O135 134B). Für die Bereitstellung der Daten aus den Kuhpopulationen danken wir drei Milchvieh-Betrieben in Mecklenburg-Vorpommern sowie dem Rinderzuchtverband Mecklenburg-Vorpommern e. G. und der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei in Mecklenburg-Vorpommern.

Literatur

- BARCELÓ-BATLLORI, S., and GOMIS, R.: Proteomics in obesity research. *Proteomics – Clinical Applications* 3, 263–278 (2009)
- BARRETT, J. C., FRY, B., MALLER, J., and DALY, M. J.: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265 (2005)
- BENNEWITZ, J., REINSCH, N., PAUL, S., LOOFT, C., KAUPÉ, B., WEIMANN, C., ERHARDT, G., THALLER, G., KÜHN, C., SCHWERIN, M., THOMSEN, H., REINHARDT, F., REENTS, R., and KALM, E.: The DGAT1 K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. *J. Dairy Sci.* 87, 431–442 (2004)
- BINDER, D. K., and SCHARFMAN, H. E.: Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22, 123–131 (2004)
- BOVENHUIS, H., and SCHROOTEN, A. C.: Quantitative trait loci for milk production traits in dairy cattle. In: 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production; pp. 27–34. Montpellier (France) 2002
- BRADÉ, W., und FLACHOWSKY, G.: Rinderzucht und Milcherzeugung: Empfehlungen für die Praxis. *Landbauforschung Völkenrode Sonderheft* 289, 39 (2005)
- CASES, S., SMITH, S. J., ZHENG, Y. W., MYERS, H. M., LEAR, S. R., SANDE, E., NOVAK, S., COLLINS, C., WELCH, C. B., LUSIS, A. J., ERICKSON, S. K., and FARESE, R. V. Jr.: Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13018–13023 (1998)
- CHAN, E. K., HAWKEN, R., and REVERTER, A.: The combined effect of SNP-marker and phenotype attributes in genome-wide association studies. *Anim. Genet.* 40, 149–156 (2009)
- DINA, C., MEYRE, D., GALLINA, S., DURAND, E., KÖRNER, A., JACOBSON, P., CARLSSON, L. M., KIESS, W., VATIN, V., LECOEUR, C., DELPLANQUE, J., VAILLANT, E., PATTOU, F., RUIZ, J., WEILL, J., LEVY-MARCHAL, C., HORBER, F., POTOCZNA, N., HERCBERG, S., LE STUNFF, C., BOUGNÈRES, P., KOVACS, P., MARRE, M., BALKAU, B., CAUCHI, S., CHÈVRE, J. C., and FROGUEL, P.: Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature Genet.* 39, 724–726 (2007)
- ELMQUIST, J. K., and FLIER, J. S.: Neuroscience. The fat-brain axis enters a new dimension. *Science* 304, 63–64 (2004)
- FAHR, R.-D.: *Milcherzeugung: Grundlagen – Prozesse – Qualitätssicherung*. Frankfurt (Main): Deutscher Fachverlag 2003
- FISCHER, J., KOCH, L., EMMERLING, C., VIERKOTTEN, J., PETERS, T., BRÜNING, J. C., and RÜTHER, U.: Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 458, 894–898 (2009)
- FLINT, J., and MACKAY, T. F.: Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Res.* 19, 723–733 (2009)
- FRAYLING, T. M., TIMPSON, N. J., WEEDON, M. N., ZEGGINI, E., FREATHY, R. M., LINDGREN, C. M., PERRY, J. R., ELLIOTT, K. S., LANGO, H., RAYNER, N. W., SHIELDS, B., HARRIES, L. W., BARRETT, J. C., ELLARD, S., GROVES, C. J., KNIGHT, B., PATCH, A. M., NESS, A. R., EBRAHIM, S., LAWLOR, D. A., RING, S. M., BEN-SHLOMO, Y., JARVELIN, M. R., SOVIO, U., BENNETT, A. J., MELZER, D., FERRUCCI, L., LOOS, R. J., BARROSO, I., WAREHAM, N. J., KARPE, F., OWEN, K. R., CARDON, L. R., WALKER, M., HITMAN, G. A., PALMER, C. N., DONEY, A. S., MORRIS, A. D., SMITH, G. D., HATTERSLEY, A. T., and MCCARTHY, M. I.: A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889–894 (2007)
- FREDRIKSSON, R., HÄGLUND, M., OLSZEWSKI, P. K., STEPHANSSON, O., JACOBSSON, J. A., OLSZEWSKA, A. M., LEVINE, A. S., LINDBLOM, J., and SCHIÖTH, H. B.: The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 149, 2062–2071 (2008)
- GELLER, F., REICHWALD, K., DEMPFLÉ, A., ILLIG, T., VÖLLMERT, C., HERPERTZ, S., SIFFERT, W., PLATZER, M., HESS, C., GUDERMANN, T., BIEBERMANN, H., WICHMANN, H. E., SCHÄFER, H., HINNEY, A., and HEBEBRAND, J.: Melanocortin-4 receptor gene variant 1103 is negatively associated with obesity. *Amer. J. Hum. Genet.* 74, 572–581 (2004)
- GERKEN, T., GIRARD, C. A., TUNG, Y. C., WEBBY, C. J., SAUDEK, V., HEWITSON, K. S., YEO, G. S., McDONOUGH, M. A., CUNLIFFE, S., McNEILL, L. A., GALVANOVSKIS, J., RORSMAN, P., ROBINS, P., PRIEUR, X., COLL, A. P., MA, M., JOVANOVIĆ, Z., FAROOQI, I. S., SEDGWICK, B., BARROSO, I., LINDAHL, T., PONTING, C. P., ASHCROFT, F. M., O'RAHILLY, S., and SCHOFIELD, C. J.: The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318, 1469–1472 (2007)
- GRISART, B., COPPIETERS, W., FARNIR, F., KARIM, L., FORD, C., BERZI, P., CAMBISANO, N., MNI, M., REID, S., SIMON, P., SPELMAN, R., GEORGES, M., and SNELL, R.: Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* 12, 222–231 (2002)

- GRISART, B., FARNIR, F., KARIM, L., CAMBISANO, N., KIM, J. J., KVASZ, A., MNI, M., SIMON, P., FRÈRE, J. M., COPPIETERS, W., and GEORGES, M.: Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 2398–2403 (2004)
- GUNSTAD, J., SCHOFIELD, P., PAUL, R. H., SPITZNAGEL, M. B., COHEN, R. A., WILLIAMS, L. M., KOHN, M., and GORDON, E.: BDNF Val66Met polymorphism is associated with body mass index in healthy adults. *Neuropsychobiology* *53*, 153–156 (2006)
- HAN, Z., NIU, T., CHANG, J., LEI, X., ZHAO, M., WANG, Q., CHENG, W., WANG, J., FENG, Y., and CHAI, J.: Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature* *464*, 1205–1209 (2010)
- HEID, I. M., et al.: Meta-analysis of the INSIG2 association with obesity including 74,345 individuals: does heterogeneity of estimates relate to study design? *PLoS Genet.* *5*, e1000694 (2009)
- HILL, W. G., GODDARD, M. E., and VISSCHER, P. M.: Data and theory point to mainly additive genetic variance for complex traits. *PLoS Genet.* *4*: e1000008 (2008)
- HILL, W. G., and ROBERTSON, A.: Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics* *38*, 226–231 (1968)
- HINNEY, A., SCHERAG, A., FRIEDEL, S., BRÖNNER, G., MÜLLER, T. D., GRALLERT, H., ILLIG, T., WICHMANN, H. E., RIEF, W., SCHÄFER, H., and HEBEBRAND, J.: Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One* *2*, e1361 (2007)
- JENSEN, R. G.: *Handbook of Milk Composition*. San Diego, California: Academic Press 1995
- KHATKAR, M. S., NICHOLAS, F. W., COLLINS, A. R., ZENGER, K. R., CAVANAGH, J. A., BARRIS, W., SCHNABEL, R. D., TAYLOR, J. F., and RAADSMA, H. W.: Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC Genomics* *9*, 187 (2008)
- KÜHN, C., THALLER, G., WINTER, A., BININDA-EMONDS, O. R., KAUPÉ, B., ERHARDT, G., BENNEWITZ, J., SCHWEIRIN, M., and FRIES, R.: Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics* *167*, 1873–1881 (2004)
- LEMAY, D. G., NGUYEN, T. T., LYNN, D. J., MARTIN, W. F., NEVILLE, M. C., CASEY, T. M., RINCON, G., KRIVENTSEVA, E. V., BARRIS, W. C., HINRICHS, A. S., MOLENAAR, A. J., POLLARD, K. S., MAQBOOL, N. J., SINGH, K., MURNEY, R., ZDOBNOV, E. M., TELLAM, R. L., MEDRANO, J. F., GERMAN, J. B., and RUNKELS, M.: The bovine lactation genome: insights into the evolution of mammalian milk. *Genome Biol.* *10*, R43 (2009)
- LEWONTIN, R. C., and KOJIMA, K.: The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution* *14*, 458–472 (1960)
- LINDGREN, C. M., et al.: Genome-wide association scan meta-analysis identifies three Loci influencing adiposity and fat distribution. *PLoS Genet* *5*, e1000508 (2009)
- LOOS, R. J., et al.: Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nature Genet.* *40*, 768–775 (2008)
- LYON, H. N., EMILSSON, V., HINNEY, A., HEID, I. M., LASKY-SU, J., ZHU, X., THORLEIFSSON, G., GUNNARSDOTTIR, S., WALTERS, G. B., THORSTEINSDOTTIR, U., KONG, A., GULCHER, J., NGUYEN, T. T., SCHERAG, A., PFEUFER, A., MEITINGER, T., BRÖNNER, G., RIEF, W., SOTO-QUIROS, M. E., AVILA, L., KLANDERMAN, B., RABY, B. A., SILVERMAN, E. K., WEISS, S. T., LAIRD, N., DING, X., GROOP, L., TUOMI, T., ISOMAA, B., BENGTSOON, K., BUTLER, J. L., COOPER, R. S., FOX, C. S., O'DONNELL, C. J., VOLLMERT, C., CELEDÓN, J. C., WICHMANN, H. E., HEBEBRAND, J., STEFANSSON, K., LANGE, C., and HIRSCHHORN, J. N.: The association of a SNP upstream of INSIG2 with body mass index is reproduced in several but not all cohorts. *PLoS Genet.* *3*, e61 (2007)
- MADSEN, M. B., BIRCK, M. M., FREDHOLM, M., and CIRERA, S.: Expression studies of the obesity candidate gene FTO in pig. *Anim. Biotechnol.* *21*, 51–63 (2010)
- MAHLKOW-NERGE, K.: Erfolgreich füttern: Fett-Eiweiß-Quotient – viel beachteter Milchkennwert. *Landpost* *34–36* (2009)
- MANOLIO, T. A., COLLINS, F. S., COX, N. J., GOLDSTEIN, D. B., HINDORFF, L. A., HUNTER, D. J., MCCARTHY, M. I., RAMOS, E. M., CARDON, L. R., CHAKRAVARTI, A., CHO, J. H., GUTTMACHER, A. E., KONG, A., KRUGLYAK, L., MARDIS, E., ROTIMI, C. N., SLATKIN, M., VALLE, D., WHITTEMORE, A. S., BOEHNKE, M., CLARK, A. G., EICHLER, E. E., GIBSON, G., HAINES, J. L., MACKAY, T. F., MCCARROLL, S. A., and VISSCHER, P. M.: Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* *461*, 747–753 (2009)
- MATUKUMALLI, L. K., LAWLEY, C. T., SCHNABEL, R. D., TAYLOR, J. F., ALLAN, M. F., HEATON, M. P., O'CONNELL, J., MOORE, S. S., SMITH, T. P., SONSTEGARD, T. S., and VAN TASSELL, C. P.: Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS One* *4*, e5350 (2009)
- MONTELEONE, P., FABRAZZO, M., MARTIADIS, V., SERRITELLA, C., PANNUTO, M., and MAJ, M.: Circulating brain-derived neurotrophic factor is decreased in women with anorexia and bulimia nervosa but not in women with binge-eating disorder: relationships to co-morbid depression, psychopathology and hormonal variables. *Psychol. Med.* *35*, 897–905 (2005)

- PURCELL, S., NEALE, B., TODD-BROWN, K., THOMAS, L., FERREIRA, M. A., BENDER, D., MALLER, J., SKLAR, P., BAKKER, P. I. DE, DALY, M. J., and SHAM, P. C.: PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Amer. J. Hum. Genet.* 81, 559–575 (2007)
- RAHMATALLA, S., MÜLLER, U., STRUCKEN, E. M., und BROCKMANN, G. A.: Der Effekt von DGAT1-Genvarianten in Deutschen Holstein Kühen unter Produktionsbedingungen. *Züchtungskunde* 80, 473–484 (2008)
- RANKINEN, T., RICE, T., TERAN-GARCIA, M., RAO, D. C., and BOUCHARD, C.: FTO genotype is associated with exercise training-induced changes in body composition. *Obesity (Silver Spring)* 18, 322–326 (2010)
- SANDERS, K., BENNEWITZ, J., REINSCH, N., THALLER, G., PRINZENBERG, E. M., KÜHN, C., and KALM, E.: Characterization of the DGAT1 mutations and the CSN1S1 promoter in the German Angeln dairy cattle population. *J. Dairy Sci.* 89, 3164–3174 (2006)
- SCHAI, D. J.: Evaluating associations of haplotypes with traits. *Genet. Epidemiol.* 27, 348–364 (2004)
- 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)
- SCHENNINK, A., HECK, J. M., BOVENHUIS, H., VISKER, M. H., VAN VALENBERG, H. J., and VAN ARENDONK, J. A.: Milk fatty acid unsaturation: genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). *J. Dairy Sci.* 91, 2135–2143 (2008)
- SCHENNINK, A., STOOP, W. M., VISKER, M. H., HECK, J. M., BOVENHUIS, H., VAN DER POEL, J. J., VAN VALENBERG, H. J., and VAN ARENDONK, J. A.: DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Anim. Genet.* 38, 467–473 (2007)
- SCHENNINK, A., STOOP, W. M., VISKER, M. H., VAN DER POEL, J. J., BOVENHUIS, H., and VAN ARENDONK, J. A.: Short communication: Genome-wide scan for bovine milk-fat composition. II. Quantitative trait loci for long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* 92, 4676–4682 (2009)
- SCHERAG, A., et al.: Two new loci for body-weight regulation identified in a joint analysis of genome-wide association studies for early-onset extreme obesity in French and German study groups. *PLoS Genet.* 6, e1000916 (2010)
- SCHLIMME, E., und BUCHHEIM, W.: Milch und ihre Inhaltsstoffe: chemische und physikalische Eigenschaften. 2. überarb. Aufl. Gelsenkirchen: Mann 1999
- SCHMITT, A. O., BORTFELDT, R. H., and BROCKMANN, G. A.: Tracking chromosomal positions of oligomers – a case study with Illumina's BovineSNP50 beadchip. *BMC Genomics* 11, 80 (2010)
- SCHMITT, A. O., und BROCKMANN, G. A.: Kartierung von Merkmal-assoziierten Genen mittels hochauflösender SNP-Daten von Maus-Inzuchtstämmen. In: FREYER, G., und BIEBLER, K. E. (Eds.): *Biometrische Aspekte der Genomanalyse III*. S. 91–98. Aachen: Shaker Verlag 2007
- SCHOPEN, G. C., KOKS, P. D., VAN ARENDONK, J. A., BOVENHUIS, H., and VISKER, M. H.: Whole genome scan to detect quantitative trait loci for bovine milk protein composition. *Anim. Genet.* 40, 524–537 (2009)
- SEBERT, S. P., HYATT, M. A., CHAN, L. L., YIALLOURIDES, M., FAINBERG, H. P., PATEL, N., SHARKEY, D., STEPHENSON, T., RHIND, S. M., BELL, R. C., BUDGE, H., GARDNER, D. S., and SYMONDS, M. E.: Influence of prenatal nutrition and obesity on tissue specific fat mass and obesity-associated (FTO) gene expression. *Reproduction* 139, 265–274 (2010)
- SOLIMAN, F., GLATT, C. E., BATH, K. G., LEVITA, L., JONES, R. M., PATTWELL, S. S., JING, D., TOTTENHAM, N., AMO, D., SOMERVILLE, L. H., VOSS, H. U., GLOVER, G., BALLON, D. J., LISTON, C., TESLOVICH, T., VAN KEMPEN, T., LEE, F. S., and CASEY, B. J.: A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science* 327, 863–866 (2010)
- STRATIGOPOULOS, G., PADILLA, S. L., LEDUC, C. A., WATSON, E., HATTERSLEY, A. T., MCCARTHY, M. I., ZELTSER, L. M., CHUNG, W. K., and LEIBEL, R. L.: Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R 1185–1196 (2008)
- THALLER, G., KÜHN, C., WINTER, A., EWALD, G., BELLMANN, O., WEGNER, J., ZÜHLKE, H., and FRIES, R.: DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim. Genet.* 34, 354–357 (2003)
- THORLEIFSSON, G., et al.: Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nature Genet.* 41, 18–24 (2009)
- VALDAR, W., SOLBERG, L. C., GAUGUIER, D., BURNETT, S., KLENERMAN, P., COOKSON, W. O., TAYLOR, M. S., RAWLINS, J. N., MOTT, R., and FLINT, J.: Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nature Genet.* 38, 879–887 (2006)
- VISSCHER, P. M.: Sizing up human height variation. *Nat. Genet.* 40, 489–490 (2008)
- WILLER, C. J., et al.: Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nature Genet.* 41, 25–34 (2009)

- WINTER, A., KRÄMER, W., WERNER, F. A., KOLLERS, S., KATA, S., DURSTEWITZ, G., BUITKAMP, J., WOMACK, J. E., THALLER, G., and FRIES, R.: Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9300–9305 (2002)
- ZIEGLER, A., and KÖNIG, I. R.: *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology: Concepts and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH 2006
- ZIELKE, L. G., BORTFELDT, R. H., TETENS, J., and BROCKMANN, G. A.: BDNF contributes to the genetic variance of milk fat yield in German Holstein cattle. *Front. Genet. Architecture* 2, 16 (2011)

Prof. Dr. Gudrun A. BROCKMANN
Züchtungsbiologie und molekulare Genetik
Department für Nutzpflanzen- und Tierwissenschaften
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

Zucht auf neue Produktionsmerkmale – Lebensmittelbiogenese in einer sich ändernden Welt

Heinrich H. D. MEYER (Freising)

Mit 3 Abbildungen und 1 Tabelle

Zusammenfassung

In der Fleischproduktion ist die Tierzucht den Vorgaben des Verbrauchers bereits vor Jahrzehnten gefolgt, und die Tierkörper moderner Rassen enthalten deutlich weniger Fett. Demgegenüber ist die Milchezusammensetzung nahezu unverändert geblieben, und eine klare Marktorientierung bzw. ein Paradigmenwechsel ist überfällig. Die Analyse des gesamten Produktionsnetzwerkes in Hinblick auf weitere Möglichkeiten der Optimierung erlaubt nicht nur die Anpassung an die Bedürfnisse der Verbraucher, sondern ist auch der effizienteste Weg zur Umweltentlastung. Die enge Kooperation aller Disziplinen von der Tier- und Pflanzenzucht bis zur Technologie und Ökonomie ist dazu unerlässlich. Die Herausforderungen der Zukunft erfordern es, den Fortschritt des Wissens verantwortungsvoll in Diagnostik und Tierzucht zu nutzen. Die allseitige Verfügbarmachung leistungsfähiger Technologien ist dabei ein vordringliches Anliegen.

Abstract

The consumer is requesting less fatty meat, animal breeding follows these requirements, and the carcass of nowadays breeds contains much less fat. In contrast, milk composition remained almost unchanged, milk fat still is a dominating ingredient, and a clear acceptance of consumer and market requirements by animal breeding and husbandry is missing. Transparent investigation of the complete production networks will provide new options to fulfill the requirements of the consumer. In addition, this will open efficient ways to reduce the burden to the environment. A close cooperation of all scientific disciplines from animal and plant breeding to technology and economy is requested. The challenges of upcoming decades will make it necessary to use all kind of new knowledge. The availability of powerful new technology to all partners will be a prerequisite.

1. Lebensmittel tierischer Herkunft im Blickwinkel der Ernährungswissenschaft

Die Protoplastenproteine der Pflanze und die Zellproteine von Mensch und Tier haben ein ähnliches Aminosäurespektrum. Die Proteine in Fleisch, Fisch, Ei und auch Kartoffel haben daher bezüglich der chemischen Analogie zur Muttermilch eine Wertigkeit in der Größenordnung von 90–100 %. Auch der biologische Wert, bei Berücksichtigung der gastro-intestinalen Verwertbarkeit, liegt bei 80–100 %. Das Kuhmilcheiweiß hat für unsere Ernährung einen ähnlich hohen biologischen Wert. Die meisten Samenproteine von Getreide, Leguminosen oder Mais sind ganz anders aufgebaut und haben vielfach geringere chemische Wertigkeiten. Bei der Verdauung sind etliche Proteine viel schwerer erschließbar, und dadurch ergeben sich beim Gesamtprotein mancher pflanzlichen Lebensmittel biologische Wertigkeiten bis

zur Größenordnung von nur einem Drittel im Vergleich zu Protoplasten-, Fleisch- oder Milchproteinen (LEHNINGER 1987). Die Proteine sind daher der eigentliche Wert der Lebensmittel tierischer Herkunft in unserer Ernährung. Hinzu kommen die vielfachen Trägerfunktionen der Proteine für Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine.

Wieso gibt es überhaupt ungesättigte Fettsäuren in den diversen Fetten von Pflanze und Tier? Im lebenden Organismus haben sie die wichtige Funktion, die Fluidität der Fette und der Membranen zu gewährleisten. Je kälter die Region ist, in der das Tier oder die Pflanze lebt, oder je geringer die Körpertemperatur des Tieres ist, umso mehr mehrfach ungesättigte Fettsäuren müssen in den Organismus eingebaut werden. Beim Leinsamen, einer borealen Pflanze, finden wir bevorzugt C18:3 bei einer Nährstoffdichte von 18 g PUFA/MJ Lipide (PUFA = *poly unsaturated fatty acids*). Bei der weiter südlich wachsenden Sonnenblume dominiert C18:2. Die Fluidität des Fettes und die PUFA-Nährstoffdichte sind geringer. Kaltwasserfische, wie Hering oder Makrele, akkumulieren C18:3 aus der Nahrung. Die homoiothermen Monogastrier Huhn und Schwein sammeln deutlich weniger PUFA. Beim Wiederkäuer werden die ungesättigten Fettsäuren im Pansen weitgehend zu C18:0 saturiert und gehen dadurch verloren. Rindfleisch und Milch enthalten nur noch ca. 0,7 g PUFA/MJ Lipide. Die Lipidfluidität im Tierkörper wird durch endogenes C18:1 erzielt. In Kuhmilch ist die kurze C4:0, die Buttersäure, für die Hemmung der Lipidkristallisation wesentlich, und damit wird die Lipidfluidität, die auch für die Verdaubarkeit wichtig ist, erreicht. Im Resümee, bei Lebensmitteln von homoiothermen Nutztieren sind die Fette wegen geringer PUFA-Nährstoffdichten kaum von ernährungsphysiologischem Interesse für den Menschen (HU et al. 1997, OH et al. 2005), sondern primär Energieträger.

Fleisch enthält nur wenige Kohlenhydrate. Das einzige Kohlenhydrat von Bedeutung in Lebensmitteln tierischer Herkunft ist das Disaccharid Laktose bei einer Konzentration von ca. 5 % in Kuhmilch. Durch die β -glykosidische Verknüpfung der beiden Monosaccharide ist sie nur für wenige Mikroorganismen zugänglich. Damit Säuglinge die Laktose in Muttermilch verdauen können, haben sie das Enzym Laktase, eine β -Glykosidase. Muttermilch haben wir vor einigen Generationen bis zu etwa drei Jahre genossen, uns danach anderweitig ernährt, und dieses Enzym wurde nicht mehr exprimiert. Der Erwachsene vor ungefähr 10000 Jahren brauchte und hatte keine β -Galaktosidase. Durch die Domestikation der Kuh wurde Milch ein interessantes Lebensmittel. Gemäß einer Arbeit von BURGER (BURGER et al. 2007) ist in ca. 7500 Jahre alten neolithischen Gräbern in Europa das Laktase-Persistenzgen (–13,910*T Allel) bereits häufig nachweisbar. Laktase wurde auch von Erwachsenen produziert, Laktose konnte genutzt werden, und damit stand mit der Milch ein Lebensmittel in einer günstigen Zusammensetzung zur Verfügung – auch im Winter. Das Laktase-Persistenzgen hat sich rasant über die Erde verbreitet – 7500 Jahre entsprechen kaum mehr als 300 Menschen-Generationen. Die Co-Evolution von früher Milchwirtschaft und vom Humanphänotyp Laktase-Persistenz sowie die gleichzeitige Verbreitung der Linearbandkeramik in Zentraleuropa untermauern die Hypothese des besonderen ernährungsphysiologischen Wertes der Milch nicht nur für Kinder, sondern auch für Erwachsene (ITAN et al. 2009). Heute tragen in manchen Regionen Europas bereits bis zu 90 % der Menschen das Laktase-Persistenzgen und können so die Laktose abbauen. Die Menschheit ist also noch mitten im Evolutionsprozess, um die Kuhmilch nutzbringend verwerten zu können. Die Frage, ob Kuhmilch wertvoll für den Einzelnen ist oder nicht, ist somit eine humangenetische Frage und nicht allgemein diskutierbar. Auch bei weiteren Inhaltsstoffen bleibt zu bedenken, dass die Kuhmilch in entwicklungsbiologischen Zeiträumen für uns ein „neues“ Lebensmittel von einer anderen Spezies ist und wir uns noch in der Anpassung befinden.

2. Verbraucher – Handel – Lebensmittelindustrie – Nutztier

2.1 Die majoren und minoren Inhaltsstoffe der Kuhmilch

Der vielseitig informierte Verbraucher greift mehr zu nährstoffreichen hochwertigen Lebensmitteln als zu den Energieträgern, und bezogen auf die Lebensmittel vom Tier besteht eine klare Präferenz für Eiweißträger mit niedrigem Fettgehalt, beispielsweise Magerfleisch. Handel und Lebensmittelindustrie haben sich dem Bedarf angepasst und reichen die Preisentwicklung an den Landwirt weiter. Auch Milch wird im Ansatz der Molkereien nach Inhaltsstoffen bezahlt und dann pro Liter verrechnet. Demgegenüber steht der metabolische Aufwand der Kuh für die Biosynthese der einzelnen Inhaltsstoffe der Milch. Arbeiten der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass der Energiebedarf der Kuh für die Biosynthese von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen der Milch in seiner Relation etwa den nutzbaren Energieäquivalenten für den Konsumenten entspricht (KIRCHGESSNER 1987). Für den Milch produzierenden Landwirt ist daher das Verhältnis von Aufwand zu Erlös pro Energieäquivalent von prioritärer Relevanz – differenziert nach Inhaltsstoffen.

Die Umrechnung der massenbezogenen Inhaltsstoffzulagen der Milchabrechnung auf Energieäquivalente ergibt, dass in den letzten Jahren für Protein 20–30 Euro-Cent pro MJ und für Milchfett nur 5–10 Euro-Cent pro MJ bezahlt wurde. Bei Rückrechnung von den aktuellen Milchpreisen ergibt sich aktuell für Laktose kein nennenswerter Erlös. Die iso-osmotische Grundlage für Milch ist eine 5 %ige Laktose, ohne Laktose kann die Kuh die Milch nicht synthetisieren. In einer durchschnittlichen Rohmilch hat die Laktose einen Energieanteil von ca. 30 %, Fett von ca. 50 % und Protein von nur ca. 20 %. Die veränderten Verbrauchergewohnheiten haben dazu geführt, dass der Landwirt aktuell ungefähr zwei Drittel des Erlöses für Milchprotein erhält; demgegenüber steht für die Proteinbiosynthese nur ungefähr ein Fünftel des metabolischen Gesamtaufwandes der Kuh. Die Erhöhung des Proteingehaltes würde es ermöglichen, den wertbestimmenden Inhaltsstoff der Milch energieeffizient zu produzieren, bei attraktiver Vergütung dem Rohmilchbedarf der Molkereien zu begegnen und der Nachfrage des Verbrauchers zu folgen.

In der Fleischproduktion ist die Tierzucht den Vorgaben des Verbrauchers bereits vor Jahrzehnten gefolgt, und die Tierkörper moderner Rassen enthalten deutlich weniger Fett. Demgegenüber ist die Milchezusammensetzung nahezu unverändert geblieben, und eine klare Marktorientierung bzw. ein Paradigmenwechsel ist überfällig.

Neben der Tierzucht werden Tierkörper- und Milchezusammensetzung auch durch Nährstoffversorgung, Tiergesundheit und Management wesentlich beeinflusst. In einer Studie mit Red-Holstein-Kühen (KESSEL et al. 2008) haben wir die Hälfte der Tiere mit dem niedrigsten BHB (β -Hydroxybutyrat) und die zweite Hälfte mit erhöhtem BHB bezüglich etlicher Parameter verglichen. Erhöhtes BHB korreliert, wie zu erwarten, mit Hypoglykämie, aber auch mit reduziertem Milchprotein und einem erhöhten Fett-Eiweiß-Quotienten. In einer kürzlich veröffentlichten Studie mit Braunviehkühen (SCHLAMBERGER et al. 2010) ist es uns gelungen, die „early lactation metabolic disorder“ fast gänzlich zu vermeiden durch gezielte Reduktion der Milchleistung *via* einmal Melken während 28 Tage nach der Geburt oder Durchmelken ohne Trockenstehphase. Beide Versuchsgruppen zeigten fast keine Hypoglykämie, deutlich erhöhtes Milcheiweiß und einen reduzierten Fett-Eiweiß-Quotienten. Die Kontrollgruppe hatte 3,52 % Eiweiß bei 11 310 l Milch (ECM), und die durchgemolkene Gruppe 4,04 % Eiweiß bei 10 633 l Milch (ECM). Der Eiweißertrag blieb unverändert hoch bei insgesamt

reduziertem metabolischem Aufwand für die durchgemolkenen Kühe. Eine weitergehende wissenschaftliche Bearbeitung der Management- und Zuchtregime zur Optimierung der Milcheiweißproduktion bietet ein großes Potential, da Eiweiß mit geringem Energieaufwand produziert werden kann. Außerdem erfordert eine unbeeinträchtigte Proteinbiosynthese im Euter einen ausgeglichenen Stoffwechsel vor allem zu Laktationsbeginn und eine hohe Adaptationsfähigkeit der Milchkühe (SCHLAMBERGER et al. 2010). Stoffwechselstabile Kühe wäre daher ein dominierendes Zuchtziel.

Die Kuhmilch bietet etliche weitere Optionen bzw. Herausforderungen, die Inhaltsstoffe dem Bedarf der Konsumenten bzw. einzelnen Konsumentengruppen anzunähern. Die Humanmilch enthält weniger Disaccharide, aber sie enthält mehr Oligosaccharide; in Kuhmilch ist das Glykomakropeptid – eine Komponente des κ -Kasein – der wichtigste Träger von Oligosacchariden und somit potentiell Zuchtziel für deren „Humanisierung“. Die in der Milchdrüse direkt produzierten gesättigten Übergangsfettsäuren, von C10:0 bis C16:0, werden durch einen früheren Kettenabbruch bei der Lipogenese verursacht; die molekularen Mechanismen sind unterschiedlich bei Rodentia und Ruminantia (DILS et al. 1980, GRUNNET et al. 1979a, b). Die gesättigten Übergangsfettsäuren sollten in der Humanernährung eher vermieden werden; für die züchterische Bearbeitung könnte das Thema aber attraktiv sein, da nur wenige Schlüsselenzyme involviert sind (KNUDSEN 1979). Weitergehende Herausforderungen sind, den Cholesteringehalt zu reduzieren (VITURRO et al. 2009) oder Eisen bzw. Lactoferrin in der Milch zu erhöhen sowie allergene Proteine züchterisch zu bearbeiten.

Tab. 1 Optionen zur Optimierung der Kuhmilch für die Ernährung des Menschen

Majore Inhaltsstoffe
– mehr Protein, insbesondere mehr Kasein
– weniger Fett
Minore Inhaltsstoffe
– mehr prebiotisches Oligosaccharid im κ -Kasein bzw. Glycomakropeptid
– mehr Fe-Laktoterrin
– mehr Proteine mit optimaler Zusammensetzung für Babyformula
– weniger gesättigte Übergangsfettsäuren nach Biosynthese in der Milchdrüse
– weniger <i>trans</i> -Fettsäuren
– weniger Cholesterin

Am 16. Juni 2010 hat das Europäische Parlament dem Kommissionsentwurf zur geänderten Lebensmitteldeklaration zugestimmt; nach Zustimmung des Europäischen Rates bedeutet dies, dass bei allen Milchprodukten der Gehalt an endogenen *trans*-Fettsäuren deklariert werden muss. *trans*-Fettsäuren stehen im Verdacht, Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu begünstigen (MOZAFFARIAN et al. 2006). Der Gehalt an *trans*-Fettsäuren in Lebensmitteln von Wiederkäuern wird wesentlich durch das Futter und durch die mikrobielle Saturation im Pansen beeinflusst (ARO et al. 1998); bei hohem PUFA-Anteil im Futter, wie bei frischem Almgras, kann der Gehalt an Vaccensäure (C18:1*trans*11) in Milchlipiden über 5 % steigen. Nach den Erhebungen an 80000 Frauen (HU et al. 1997) sowie an 120000 Frauen (OH et al. 2005) können diese Gehalte an *trans*-Fettsäuren bei hohem MilCHFettanteil in der Nahrung durchaus gesundheitsrelevant

sein. Die gefundenen großen tierindividuellen Unterschiede innerhalb von Fütterungsgruppen machen es aber interessant zu prüfen, ob auch durch züchterische Maßnahmen eine Beeinflussung des *trans*-Fettgehaltes möglich ist (PRECHT 1995, REGO et al. 2004).

Da die Vaccensäure durch die endogene *delta*9-Desaturase in Leber und Fettgewebe in die CLA (konjugierte Linolsäure) C18:2*cis*9,*trans*11 („ruminic acid“) umgewandelt wird und da die Enzymaktivität der *delta*9-Desaturase im Organismus massiven vielfältigen Regulationen unterliegt (OSHINO und SATO 1972), ist ein genetischer Einfluss naheliegend und die Chance der züchterischen Beeinflussung von *trans*-Fettsäuren sowie auch von CLA aus Sicht der Physiologischen Chemie plausibel.

2.2 *Minore Inhaltsstoffe im Schweinefleisch – die Ebergeruchsstoffe*

Die drei *delta*16-Androgene sind aufgrund ihrer besonderen Struktur (dehydratisierte Steroide) bei Normaltemperatur flüchtig, werden im Hoden der geschlechtsreifen männlichen Suidae produziert und sind ein wichtiges Pheromon zur Fertilitätssteuerung der Sau, wobei die Perzeption unbewusst über das vomeronasale Organ erfolgt (CLAUS et al. 1994). Vom Menschen werden die *delta*16-Steroide als Geruchsstoffe bewusst wahrgenommen; die individuelle Sensitivität und Bewertung ist äußerst unterschiedlich. Als Grenzwert für genussfähiges Schweinefleisch werden < 0,5 ppb im Fett empfohlen (BGBl 1996). Die einfachste Vermeidungsstrategie, die Kastration, wird aktuell in der Öffentlichkeit heftig diskutiert. Ähnlich effizient sind auch die Hemmung der Steroidsynthese durch Induktion des „negativ feedback“ über exogene Sexualsteroiden während des letzten Mastmonates (DAXENBERGER et al. 2001), oder weiterhin die komplette Blockade der gonadotropen Achse durch aktive Immunisation gegen Gonadotropin-Releasinghormon (DUNSHEA et al. 2001). Letzteres Verfahren ist in vielen Staaten zugelassen, findet aber in Deutschland keine Akzeptanz, und es bleibt eine Forderung der Verbraucherassoziationen, eine Lösung zu finden.

Was kann man im Rahmen der Züchtung tun? Es wäre ideal, wenn man die Bildung der *delta*16-Steroide vermeidet, ohne die Biosynthese von Testosteron und Estradiol zu beeinträchtigen (Abb. 1). In den „KEGG pathways“ ist der Weg zum *delta*16-Steroid Androstenon nicht ausgezeichnet. Die aktuelle Publikationslage besagt, dass ausgehend vom Pregnenolon zwei Enzyme aufgrund ihrer Nebenaktivität beim Schwein zum *delta*16-Steroid Androstenon führen (KATKOV und GOWER 1970). Diese beiden Enzyme, CYP17 und CYPb5, haben weitere Hauptfunktionen in der Steroidbiosynthese. Möglicherweise ist deren Proteinstruktur bei Suidae leicht verändert, so dass auch Androstenon produziert wird. Es ist eine lohnende Herausforderung, hier die funktionalen und genetischen Zusammenhänge zu beleuchten, und es wäre eine ideale Lösung beim Mastschwein, CYP17 und CYPb5 mit der Struktur zu haben, wie es bei anderen Tierarten auch vorliegt: Enzyme, die ihre Aufgabe in der Steroidbiosynthese tun, aber nicht nebenbei das *delta*16-Steroid Androstenon produzieren.

Eber wachsen deutlich schneller als Kastraten, sie zeigen eine wesentlich bessere Futtereffizienz und Nährstoffökonomie (HANSSON et al. 1974) sowie eine günstigere Schlachtkörperzusammensetzung (HANSSON et al. 1975). Die züchterische Lösung der Vermeidung von *delta*16-Steroiden unter Erhaltung der testikulären Produktion der endogenen Anabolika Testosteron plus Estradiol (DAVIS und SQUIRES 1999, SINCLAIR und SQUIRES 2005) bietet daher:

- eine verbesserte Lebensmittelqualität durch reduzierten Ebergeruch;
- ist die perfekte Lösung im Sinne des Tierschutzes;

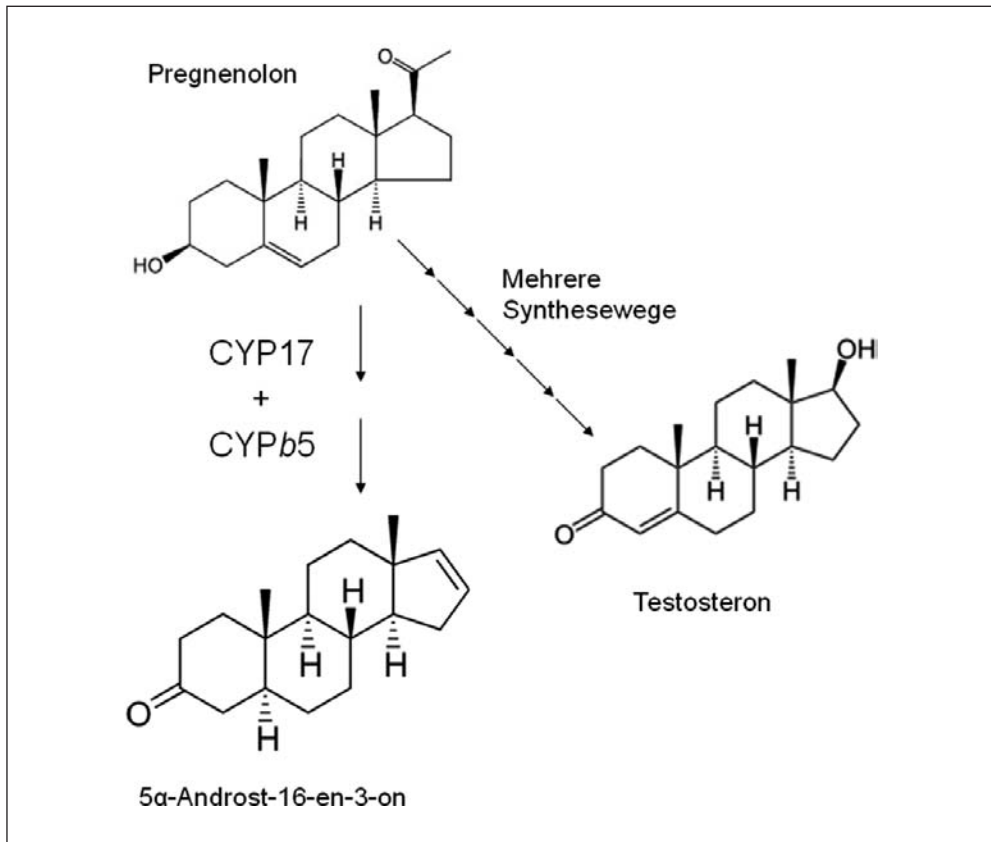


Abb. 1 Biosynthese des Ebergeruchsstoffes Androstenon und des Sexualhormons Testosteron

- eine betriebswirtschaftlich attraktive Perspektive für den Mäster;
- benötigt einen geringeren Einsatz von Ressourcen.

3. Demographische Veränderungen

3.1 Weltbevölkerung

Die Zahl der Erdenbewohner nimmt stetig zu; täglich müssen 200 000 essende Köpfe mehr ernährt werden (UN 2008). Wöchentlich wird ein Pendant der Größe von Wien neu erbaut, und jede weitere Woche kommt ein zusätzliches „Wien“ über die Erde verteilt dazu. Im Jahre 2009 haben erstmalig mehr als eine Milliarde Menschen auf der Erde gehungert. In den letzten Jahrzehnten hat die Lebensmittelbiogenese nur ähnlich schnell zugenommen wie der Bevölkerungszuwachs. Die wesentlichen prognostischen Reports der UN-Organisationen (FAO 2002, 2009, OECD-FAO 2009) fordern eine beschleunigte Verbesserung der Lebensmittelverfügbarkeit für alle sowie eine schnellere Verbesserung der Produktionseffizienz. Effizi-

entere Linien und Rassen zeigen insbesondere in Entwicklungsländern große Vorteile – bei adäquater Ausbildung auch in kleinbäuerlichen Strukturen.

Für die Ernährung aller gibt es nur zwei Optionen: Der Weg 1, wir holzen den Urwald weiter ab, oder der Weg 2, wir steigern die Effizienz unserer Lebensmittelproduktion; eine neue Analyse zeigt sehr klar, dass die Effizienzsteigerung in der Agrarwirtschaft in der Vergangenheit den Raubbau an den letzten Naturreservoirern in Grenzen gehalten hat (BURNLEY et al. 2010). Ohne Frage ist es die größte Herausforderung an die Tierzucht, den Bedarf an Ressourcen pro Einheit hochwertiger Lebensmittel weiter drastisch zu reduzieren (PLACE and MITLOEHNER 2010). Nur die Minimierung des Flächenbedarfes ermöglicht es, Reservoirre hoher Biodiversität zu erhalten und zu rekreieren.

Die Weiterentwicklung der modernen Diagnostik, die Anwendung der Erkenntnisse in der Tierproduktion und auch der verantwortungsvolle Einsatz von Biotechnologie und Gentechnik sind alternativlos, um das erforderliche jährliche Wachstum der globalen Lebensmittelproduktion zu erreichen. Wichtige politische Entscheidungen in Deutschland und anderen Regionen der EU haben solide wissenschaftliche Erkenntnisse zum Nutzen neuer Technologien nicht beachtet (RICROCH et al. 2010) und somit einen größer werdenden Produktionsnachteil der Lebensmittelproduktion in der hiesigen Agrarwirtschaft bewusst in Kauf genommen.

3.2 „Aging“

Mit zunehmendem Alter geht der Energieverbrauch unseres Organismus zurück, aber der Bedarf an essentiellen Nährstoffen bleibt auf einem ähnlichen Niveau. Der aktuelle Trend zu fettarmen Lebensmitteln mit hoher Nährstoffdichte (Gehalt pro MJ) für Eiweiß, Vitamine, Mineralien usw. ist sicherlich ein Resultat der verbesserten Verbraucherinformation, aber auch die Konsequenz sich ändernden Bedarfes aufgrund steigenden Durchschnittsalters der Bevölkerungen. Ausgewählte Lebensmittel tierischer Herkunft können genau diesen Anspruch hervorragend bedienen; fettarmer Joghurt hat eine fast unübertreffbare Nährstoffdichte für essentielle Aminosäuren, für etliche Vitamine und insbesondere für Mineralien in einer ausgewogenen Komposition. Es ist eine wesentliche Herausforderung an die Tierzucht, diesem Trend und der Bedarfsänderung zu folgen. Dem steht gegenüber, dass Lipide in Lebensmitteln tierischer Herkunft kritischer und differenzierter zu betrachten sind.

Cholesterin kommt nur in Lebensmitteln tierischer Herkunft vor, und gemäß Empfehlungen der WHO sollte der tägliche Verzehr 300 mg nicht überschreiten. Neuere Arbeiten zeigen, dass die individuelle Sensitivität eine Frage der Humangenetik ist: Im Vergleich zum Wildtyp wird bei Personen mit einer häufig vorkommenden Mutante des ABCG5/8-Transporters nach Cholesterinaufnahme der Cholesterinspiegel des Blutes deutlich stärker erhöht (VITURRO et al. 2006). Erklärt wird dies durch beeinträchtigten Cholesterinrücktransport in der Darmepithelzelle. Diese Arbeiten kennzeichnen einen deutlichen Unterschied in der Cholesterinsensitivität der Lebensmittelkonsumenten in Abhängigkeit von den zwei ABCG5/8-Polymorphismen und damit ein unterschiedliches altersbedingtes Risiko für Cholesterin assoziierte Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Hauptquellen für Nahrungscholesterin sind Ei und Milch. Das führt zu der Frage, ob man über die Erzeugung von Nahrungsstoffen tierischer Herkunft Einfluss nehmen kann. Kann man das hochwertige Eiweiß erhalten und trotzdem weniger Cholesterin verzehren? Die Frage ist, gibt es überhaupt unterschiedliche Werte in der Milch der einzelnen Tiere? Unsere neueren Arbeiten zeigen, dass es in einzelnen Milchproben erhebliche Unterschiede bezüg-

lich des Cholesterinniveaus gibt (VITURRO et al. 2010). Es bestehen starke Assoziationen zur Stoffwechsellage und zum Laktationsstadium der Kühe, aber weniger zur Milchezusammensetzung und nicht zum Cholesterin im Blut. Größenordnungsmäßig liegen die Konzentrationen im Blut etwa zehnfach höher als in der Milch. Damit ist offen, ob auch Rücktransporte eine Rolle spielen. Demgegenüber besteht ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Cholesterinabgabe durch die Milch und der Expression der Syntheseeenzyme plus Regelfaktoren in der Leber während der einzelnen Laktationsstadien (VITURRO et al. 2009). Auch in der Milchdrüse wurden etliche Faktoren von Cholesterinbiosynthese und -transport gefunden (FARKE et al. 2006). Studien zur Erkennung genetischer Einflüsse auf den Cholesterintransfer in die Milch liegen uns aus der Literatur nicht vor. Da die wichtigsten Faktoren der Cholesterinhomöostase bekannt und in anderen Spezies gut untersucht sind, erscheint eine Studie zur Genotyp-Phänotyp-Assoziation machbar – als potentielle Grundlage für zukünftige züchterische Maßnahmen.

3.3 Ethnien

Der Anteil der islamischen Bevölkerung in Deutschland beträgt aktuell 5 % und in Europa 5,2 % (PewResearchCenter 2009), bei schneller Zunahme und dem niedrigen Durchschnittsalter von nur 30,1 Jahren (HAUG et al. 2010); nach Russland lebt die zweitgrößte muslimische Parallelgesellschaft Europas in Deutschland. Die Praxis der Lebensmittelproduktion und -qualitätssicherung hierzulande stellt sich bereits auf den speziellen Bedarf ein (*Halal Control* 2010); die besonderen Verzehrsgewohnheiten der Muslime werden das Spektrum der benötigten Lebensmittel tierischer Herkunft zunehmend verändern und damit auch die Forderungen an die hiesige Tierzucht – oder man überlässt dieses Segment mehr und mehr dem Import aus anderen Kontinenten.

4. Tiergesundheit und Tierhaltung

Neben der Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere sind die Gefährdung der menschlichen Gesundheit und die wirtschaftlichen Verluste die wichtigste Motivation für die intensive Bearbeitung von Tiererkrankungen. Darüber hinaus bedeuten Erkrankungen auch Produktionsausfall, verkürzte Lebenserwartung und erhöhten Ressourcenbedarf. Die Herdengesundheit betrifft den Ressourcenverbrauch und die Emission pro Einheit Lebensmittel durch die Erhöhung der Mortalität, den Verlust marktfähiger Produkte, eine reduzierte Produktionseffizienz und geringere Fortpflanzungsraten. Neben allen Faktoren von Management und Fütterung spielt die Genetik bzw. die Widerstandsfähigkeit eine wichtige Rolle. Eine Auswertung in Spanien zeigt, dass die Senkung der Mastitisinzidenz um ca. ein Drittel eine Reduktion der Umweltbelastung pro Einheit Lebensmittel von 2,5 % bedeutet (HOSPIDO und SONESSON 2005). Ähnliche Bewertungen ergeben sich für Klauenprobleme, Lahmheiten oder andere Erkrankungen (LEBLANC et al. 2006).

Mastitis, eine Entzündung der Milchdrüse, verursacht durch invasive Pathogene, ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten in der Milchproduktion (SEEGERS et al. 2003). Berechnungen zeigen, dass in Niedersachsen jeder produzierte Liter Milch mit Kosten von ca. 2 Cent aus Mastitiden belastet ist (KRÖMKER 2007). Durch den limitierten Fortschritt bei der Verbesserung der Eutergesundheit durch die ausschließliche Verwendung von indirekten

Markern, wie der Zellzahl, ist das Interesse an selektiveren molekularen Markern gestiegen (KÜHN et al. 2003).

In einer kürzlich von uns realisierten Studie (GRIESBECK et al. 2008, 2009) haben wir untersucht, ob tierindividuelle Milchdrüsenepithelzellen in Kultur unterschiedlich resistent gegenüber Infektionserregern sind. Wenn Infektionen die Alveolen erreichen, haben Epithelzellen die Aufgabe, die Infektion zu erkennen und die Immunabwehr zu initiieren. Nach Schlachtung von Kühen unterschiedlicher Resistenz wurden die Epithelzellen in Kultur genommen und dann untersucht, ob es Unterschiede bei der Pathogenerkennung, bei der intrazellulären Signalkaskade, bei Transkriptionsfaktoren sowie bei den extrazellulären Zytokinen und Abwehrkomponenten gibt. Das Ergebnis zeigt, dass die einzelnen Epithelzellkulturen unterschiedliche Aktivität zeigen, was die Infektionsabwehrkompetenz betrifft. Die Expression des *Toll-like-Rezeptor 2* (TLR2) wird bei Mastitis insensitiven Kühen sehr viel stärker induziert als in den Zellkulturen sensibler Tiere. Analog wurden auch die abhängigen intrazellulären und sekretierten Faktoren verändert exprimiert – TNF α , IL-1 β , IL-8 und RANTES haben Funktionen bei der Leukozytenattraktion und Diapedese in die Milchdrüse; diese Zytokine waren signifikant höher bei den insensitiven Tieren (IL – Interleukin; TNF – Tumornekrosefaktor; RANTES – *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*). Dies betrifft auch das Lactoferrin, ein antimikrobielles Protein der Milch, produziert in der Milchdrüsenepithelzelle.

Hier gibt es ein offensichtliches genetisches Potential im funktionalen Umfeld der TLR-Biochemie und damit eine Reihe neuer Forschungsaufgaben: Epithelzellen direkt aus der Milch zu gewinnen, um einen erleichterten Zugang in die Diagnostik mit individuellen Zellkulturen zu haben, die Analytik auch auf Proteinniveau zu entwickeln, die funktionalen Komplexe zu beleuchten, die regulatorischen Schlüsselfaktoren zu finden, zugehörige Polymorphismen zu identifizieren und eventuell gezielt widerstandsfähigere Tiere zu züchten.

5. Ressourcen, Klima und Umwelt

Umweltrelevante Bedenken zur Tierhaltung betrafen früher insbesondere lokale Beeinträchtigungen durch Futter und Exkrete. Heute steht jedoch die Emission von Klimagasen bzw. Treibhausgasen sowie deren Auswirkung auf Luftqualität und globales Klima im Mittelpunkt. Ein weiterer wesentlicher Gesichtspunkt ist der Flächenbedarf pro Einheit Lebensmittel. Für eine zweckmäßige Gesamtbewertung setzt sich jedoch das „life cycle assesment“ bei Betrachtung des Gesamtinputs *versus* Gesamtoutputs aller Produkte eines Tieres durch (CASEY und HOLDEN 2005, CAPPER et al. 2009). Noch weitergehend ist die Bewertung der gesamten Produktionssysteme und deren Vernetzung (STEINFELD et al. 2006). Wesentlich ist dabei, die Kalkulation und finale Bewertung auf die Produkteinheiten zu beziehen und nicht pro Tier. In der gegenwärtigen Literatur werden für den Output in der Regel die Energieäquivalente der Lebensmittel herangezogen; es bleibt zu hinterfragen, ob das Megajoule tierisches Protein eine noch bessere Bezugseinheit ist. Deutlich weiterreichender wäre die Betrachtung der erforderlichen Ressourcen und der resultierenden Belastungen in Bezug auf die Produkteinheit im Ladenregal. Im Folgenden soll betrachtet werden, wo in einem Produktionsnetzwerk, hier am Beispiel Milch, eingegriffen werden kann, um effizienter zu werden (Abb. 2).

Die Produktionskette bzw. das -netzwerk beginnt mit der ersten Prozessebene: die Futterpflanzenproduktion und -züchtung mit Zellulose, Stärke, Proteinen, Lipiden und sonstigen mi-

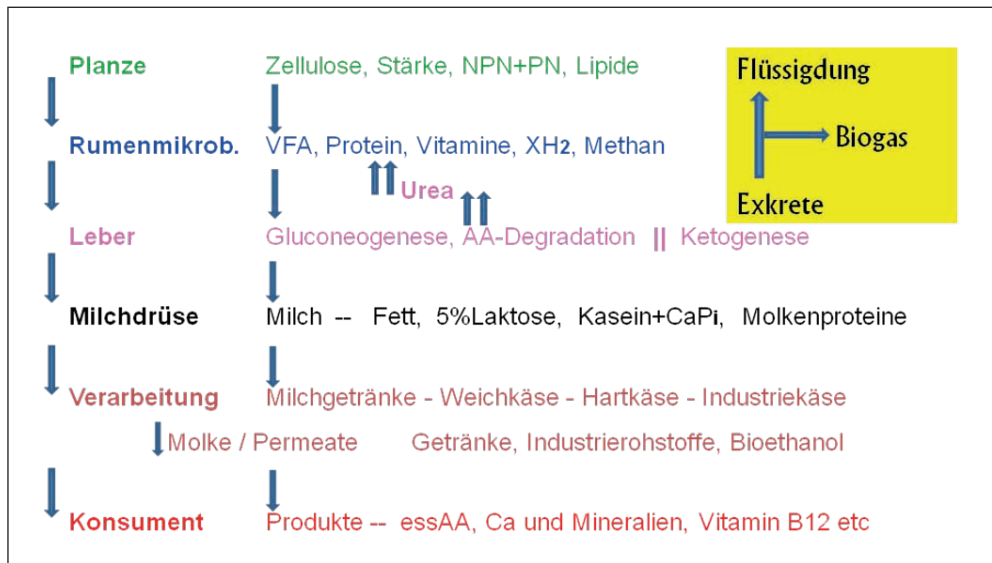


Abb. 2 Milchproduktionsnetzwerk

noren Nährstoffen als Futtergrundlage. In der zweiten Prozessebene, im Pansen, werden diese Bestandteile weitgehend von Mikroben abgebaut und umgewandelt. Die wichtigsten Produkte sind die volatilen Fettsäuren sowie die mikrobiellen Proteine und Vitamine. Im anaeroben Pansenmilieu werden ungesättigte Bindungen in Lipiden und anderen Verbindungen des Futters weitestgehend hydriert und somit in der Funktion verändert. Ein wesentliches Problem ist, dass etwa 5 % der zugeführten Energie in Methan umgewandelt wird, so für das Tier verloren geht und darüber hinaus ein wesentliches Umweltproblem der Wiederkäuerhaltung darstellt.

Das Nährstoffspektrum, das dem Organismus aus der Pansenfermentation zur Verfügung steht, kann für die Milchbiosynthese kaum direkt genutzt werden, und es wird in der dritten Prozessebene vom weiteren Gastrointestinaltrakt sowie von der Leber in für die Milchdrüse verwertbare Nährstoffe umgewandelt – soweit das Repertoire an Stoffwechselwegen im Wirbeltier bzw. in der Kuh es ermöglicht. Aufgrund des enormen Bedarfes an Glukose für die Milchsynthese steht die Gluconeogenese im Mittelpunkt des hepatischen Stoffwechsels der Hochleistungsmilchkuh. Wichtigstes Substrat ist Propionat, gefolgt von den glucoplastischen Aminosäuren. Die Umsetzung der Aminosäuren liefert Harnstoff, der partiell zum Pansen rücktransportiert wird und dort Schlüsselnährstoff für Mikrobenproliferation und den zügigen Futterabbau ist. Eine weitere wichtige Funktion von Pansenepithel und Leber ist die Ketogenese – ein wichtiger Stoffwechselweg der Wiederkäuer, der aus Lipiden hydrophile Energieträger als Ersatz für Glukose generiert.

Als vierte Prozessebene der Stoffumwandlung ist die Milchbiosynthese in der Milchdrüsenalveole einzuordnen. Glukose ist essentiell für die Synthese von Laktose und von Kohlenhydrat enthaltenden Makromolekülen; ferner ist Glukose semi-essentiell für die NADPH-Regeneration als Grundlage für Lipogenese und weitere Redoxreaktionen bei der Milchbiosynthese. Nicht für die Gluconeogenese verwertete Aminosäuren bilden die essentielle Grundlage für die Proteinbiosynthesewege der Milchdrüsenepithelzelle. Genetik und Physiologie der Regelung

des Kasein-Molkenprotein-Verhältnisses sind wissenschaftlich wenig bearbeitet; ein markanter Faktor ist die Eutergesundheit, da Mastitiden zur massiven Senkung der Kaseinsynthese führen (HARMON 1994, BRUCKMAIER 2005). Die Lipogenese kann diverse Substrate aus Depot, Futter oder Stoffwechsel nutzen und ist damit am anpassungsfähigsten.

Neben der traditionellen Zentrifugation nutzt die Milchverarbeitung als vierte Prozessebene der Nährstoffkette inzwischen ein stark erneuertes Spektrum an Technologien, wie Mikro-, Ultra- oder Nanofiltration, zur Separation der Milchinhaltsstoffe. Ziele sind die Standardisierung von Prozessen bei der Produktherstellung sowie die ständig verbesserte Verwertung aller Inhaltsstoffe zur Optimierung des Erlöses. Produkte, die eine Kaseinpräzipitation erfordern, wie Joghurt, Frisch-, Weich-, Hart- oder Industriekäse, zeigen eine sehr positive Marktentwicklung auf vielen Märkten der Welt und ersetzen zunehmend Frischmilch oder Milchgetränke. Nebenprodukte auf der Basis von Permeaten oder Molke werden zunehmend entwickelt, wobei der Einsatz in Lebensmitteln ökonomisch attraktiver ist als die Produktion von Rohstoffen für die Industrie oder von Bio-Ethanol.

Dem Verbraucher als letztem Glied der Kette steht ein ernährungsphysiologisch hochwertiges, hygienisches Lebensmittel zur Verfügung. Durch seine Wahl bestimmt er die Marktentwicklung, gegenwärtig hin zu proteinreichen Produkten. Anzumerken bleibt, dass Milch und Milchprodukte vollständig verwertet werden; die Biogenese der Milch ist ein Prozess ohne Nebenprodukte.

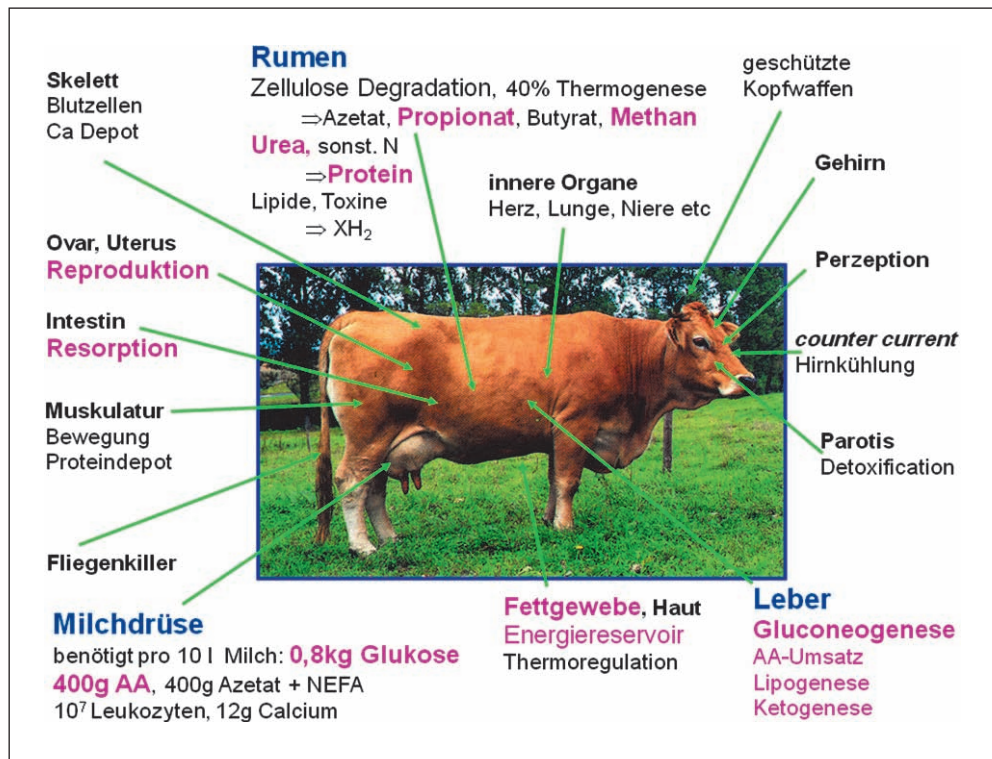


Abb. 3 Züchterisch interessante Ansatzpunkte

Für die Formulierung neuer Zuchtziele zur Verbesserung der Nährstoffökonomie der Produktionskette von der Futterpflanze bis zum Verbraucher ergeben sich aus physiologischer Sicht folgende Ansatzpunkte (Abb. 2 und 3):

- Optimierung des Futterwertes der Gesamtpflanze, insbesondere der Maispflanze (SCHWARZ und MEYER 2010). Speziell die geringe und sehr variable Verwertung der Maisproteine von bis zu weniger als 50 % (VON KEYSERLINGK et al. 1996, ROMAGNOLO et al. 1994, PAUL et al. 2010) ist eine Herausforderung zur engen Kooperation von Pflanzenzucht und -anbau, von Technologie sowie von den Disziplinen der Tierproduktion. Eine stabile und effizientere Verwertung des Mais-Rohproteins könnte den Bedarf an Soja und anderen Proteinträgern reduzieren.
- Systematische Studien zur Assoziation von Phänotypus und Genotypus bei der Futterverwertung. Insbesondere Stickstoffökonomie bzw. die Effizienz des Stickstofftransportes sind von großer ernährungsphysiologischer Bedeutung und scheinen hoch variabel zwischen Individuen zu sein (ABDOUN et al. 2006). Offensichtlich haben die UT-B-Transporter im Pansen eine Schlüsselrolle bei der Harnstoffausscheidung und damit für die Stickstoffbilanz der Wiederkäuer (STEWART et al. 2005, SIMMONS et al. 2006). Ansätze zur Neujustierung des N-Bedarfs von Milchkühen zeigen ein klares Potential zur N-Einsparung und Reduktion der Umweltbelastung (CASTILLO et al. 2001). Wiederkäuer haben prinzipiell die Fähigkeit, die benötigten Proteine über die Pansenflora nach Bereitstellung des Stickstoff aus dem Leberstoffwechsel („urea salvage“) selbst zu synthetisieren und damit die N-Ökonomie zu verbessern (MUSCHER et al. 2010); aus der aktuellen Literatur sind kaum Ansätze zur züchterischen Bearbeitung dieser Fragestellung zu erkennen.
- Die Bereitstellung von Substraten für die Milchbiosynthese in der Milchdrüsenepithelzelle und die Erhaltung der Stoffwechselstabilität zur Gewährleistung der Funktionen aller weiteren Organe sind die Hauptaufgaben der Leber – im Rahmen ihrer komplexen Gesamtfunktion bei Stoffwechsel und Homöostasen. Vor dem Hintergrund des enormen Glukose- und Aminosäurenbedarfes der Milchdrüse sind die Glukoseökonomie, Aminosäureneinsparung, die moderate Ketogenese zur Produktion hydrophiler Energielieferanten und deren Verwertung wichtige Stoffwechselleistungen des Organismus; auch die Adaptationsfähigkeit der für den erwachsenen Wiederkäuer atypischen intestinalen Glucoseresorption ist bei der Milchkuh eine wichtige Fragestellung (MATTHÉ et al. 2001). Für Stoffwechselimbilanzen ist die Änderung des Fett-Eiweiß-Quotienten ein bedingt geeigneter, leicht erfassbarer Indikator (KESSEL et al. 2008, BUTTCHEREIT et al. 2010); diese Studien zeigen große tierindividuelle Unterschiede bezüglich Stoffwechselstabilität und somit Ansatzpunkte zur weiteren Bearbeitung. Eine gute Persistenz bzw. der Verlauf der Laktationskurve sind Optionen, Stoffwechselspitzen und Tierbelastung zu vermeiden, mehr tierisches Protein zu produzieren (SCHLAMBERGER et al. 2010) und somit die Emission pro MJ Milchprotein zu reduzieren.
- Aus Sicht der Milch verarbeitenden Industrie steht die Verfügbarkeit und Konzentration von Kasein im Vordergrund. Bei hoch industrialisierten Molkereien wird die Milch mit Filtrationseinrichtungen vorkonzentriert (Umkehrosmose, Mikro-, Ultra- und Nanofiltration), um hohe Ausbeuten bei kontinuierlich laufenden Prozessen aus den Retentaten zu haben. Die dabei anfallenden großen Mengen Permeate sind Grundlage weiterer spezieller Produkte mit in der Regel geringerem Erlös (besondere Getränke, Industrierohstoffe, Bioethanol, Tierfutter etc). Milch mit hohen Konzentrationen marktfähiger Inhaltsstoffe,

insbesondere hohem Kasein, würde den Aufwand bei der Verarbeitung reduzieren bzw. käme dem Bedarf des Konsumenten entgegen. Die Vermeidung der Produktion von Inhaltsstoffen mit geringem (Fett) oder marginalem (Laktose) Marktwert wäre der effizienteste Weg zu Ressourcen- und Klimaschonung – einen Paradigmenwechsel in der Tierzucht mit dem Fokus auf Inhaltsstoffe mit hohem Marktwert wäre der nachhaltigste Weg.

Im Resümee: Die Durchleuchtung des gesamten Produktionsnetzwerkes auf weitere Möglichkeiten der Optimierung ist der effizienteste Weg zur Umweltentlastung. Die enge Kooperation aller Disziplinen von der Tier- und Pflanzenzucht bis zur Technologie und Ökonomie ist dazu unerlässlich.

6. NGOs, Politik und Medien

Wenn die Produktivität in der Tierproduktion verbessert werden soll, dann sind komplexe Zusammenhänge zu berücksichtigen. Es ist eher kontraproduktiv, wenn NGOs (*Non-Governmental Organisations*) ihre Mediensprecher nach eigenem Ermessen als Experten bezeichnen und Aussagen in die Landschaft stellen, die nicht dienlich sind, um in der Lebensmittelproduktion sachgerecht weiterzukommen. Diese Aufgaben kann man nur mit einer soliden Wissenschaft lösen und Entscheidungen nur auf seriöser Basis treffen. Vor dem Hintergrund der gigantischen Herausforderungen der Zukunft ist es unerlässlich, den Fortschritt des Wissens verantwortungsvoll in Diagnostik und Tierzucht zu nutzen. Die allseitige Verfügbarmachung leistungsfähiger Technologien bleibt ein dringliches Anliegen.

7. Schlussfolgerungen

Die Großtrappe, eine magische Tierart ähnlich wie der Pandabär, gibt es in Deutschland nur noch in ca. 50 Exemplaren in Brandenburg. Sie ist der schwerste flugfähige Vogel auf der Erde, und solche Tiere sollten auch in Zukunft einen Lebensraum in Deutschland haben. Das zwingt uns, dass wir die Spots hoher Biodiversität mindestens in ihrer Größe erhalten. Mit der Lebensmittelproduktion sollten wir auf den Flächen bleiben, die wir jetzt nutzen, und diese Flächen auch nicht vergrößern, sondern eher an Naturreservoir abtreten.

Vor diesem Hintergrund steht die Tierzucht vor der Aufgabe, die Effizienz der Lebensmittelproduktion als Grundlage für eine nachhaltige Ressourcenschonung und Umweltentlastung stetig zu steigern. Die absehbare Änderung der Marktanforderungen sollte veranlassen, in Zukunft den Fokus mehr auf Produktzusammensetzung und einzelne Inhaltsstoffe zu richten.

Literatur

- ABDOUN, K., STUMPF, F., and MARTENS, H.: Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Anim. Health Res. Rev.* 7, 43–59 (2006)
- ARO, A., ANTOINE, J. M., PIZZOFERRATO, L., REYKDAL, O., and VAN POPPEL, G.: The TRANSFAIR Study: Transfatty acids in dairy and meat products from 14 European countries. *Journal of Food Composition and Analysis* 11, 150–160 (1998)
- BGBI.: Änderungsverordnung zur Fleischhygieneverordnung. In: BGBI., S. S2120 (1996)

- BRUCKMAIER, R. M.: Gene expression of factors related to the immune reaction in response to intramammary *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. *J. Dairy Res.* 72, 120–124 (2005)
- BURGER, J., KIRCHNER, M., BRAMANTI, B., HAAK, W., and THOMAS, M. G.: Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3736–3741 (2007)
- BURNEY, J. A., DAVIS, S. J., and LOBELL, D. B.: Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 12052–12057 (2010)
- BUTTCHEREIT, N., STAMER, E., JUNGE, W., and THALLER, G.: Evaluation of five lactation curve models fitted for fat: protein ratio of milk and daily energy balance. *J. Dairy Sci.* 93, 1702–1712 (2010)
- CAPPER, J. L., CADY, R. A., and BAUMANN, D. E.: The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. *J. Anim. Sci.* 87, 2160–2167 (2009)
- CASEY, J. W., and HOLDEN, N. M.: The relationship between greenhouse gas emissions and the intensity of milk production in Ireland. *J. Environ. Qual.* 34, 429–436 (2005)
- CASTILLO, A. R., KEBREAB, E., BEEVER, D. E., BARBI, J. H., SUTTON, J. D., KIRBY, H. C., and FRANCE, J.: The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *J. Anim. Sci.* 79, 247–253 (2001)
- CHALUPA, W.: Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. *J. Dairy Sci.* 58, 1198–1218 (1975)
- CLAUS, R., WEILER, U., and HERZOG, A.: Physiological aspects of androstene and skatol formation in the boar—a review with experimental data. *Meat. Sci.* 38, 289–305 (1994)
- DAVIS, S. M., and SQUIRES, E. J.: Association of cytochrome b5 with 16-androstene steroid synthesis in the testis and accumulation in the fat of male pigs. *J. Anim. Sci.* 77, 1230–1235 (1999)
- DAXENBERGER, A., HAGELEIT, M., KRAETZL, W. D., LANGE, I. G., CLAUS, R., LE BIZEC, B., and MEYER, H. H. D.: Suppression of androstenone in entire male pigs by anabolic preparations. *Livestock Product. Sci.* 69, 139–144 (2001)
- DILS, R. R., and KNUDSEN, J.: Milk fat composition and biosynthesis in non-ruminants and ruminants. *Biochem. Soc. Trans.* 8, 292–294 (1980)
- DUNSHAE, F. R., COLANTONI, C., HOWARD, K., MCCAULEY, I., JACKSON, P., LONG, K. A., LOPATICKI, S., NUGENT, E. A., SIMONS, J. A., WALKER, J., and HENNESSY, D. P.: Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J. Anim. Sci.* 79, 2524–2535 (2001)
- FAO: World Agricultural Towards 2015/2030. (2002)
- FAO: How to Feed the World in 2050. (2009)
- FARKE, C., VITURRO, E., MEYER, H. H., and ALBRECHT, C.: Identification of the bovine cholesterol efflux regulatory protein ABCA1 and its expression in various tissues. *J. Anim. Sci.* 84, 2887–2894 (2006)
- FLACHOWSKY, G.: Nährstoffökonomische und ökologische Aspekte bei der Erzeugung von essbarem Eiweiß tierischer Herkunft bei unterschiedlichem Leistungsniveau der Nutztiere. *Lohmann Information* 2, 1 (2001)
- GRIESBECK-ZILCH, B., MEYER, H. H. D., KÜHN, C. H., SCHWERIN, M., and WELLNITZ, O.: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 91, 2215–2224 (2008)
- GRIESBECK-ZILCH, B., OSMAN, M., KÜHN, C. H., SCHWERIN, M., BRUCKMAIER, R. H., PFAFFL, M. W., HAMMERLE-FICKINGER, A., MEYER, H. H. D., and WELLNITZ, O.: Analysis of key molecules of the innate immune system in mammary epithelial cells isolated from marker-assisted and conventionally selected cattle. *J. Dairy Sci.* 92, 4621–4633 (2009)
- GRUNNET, I., and KNUDSEN, J.: Fatty-acid synthesis in lactating-goat mammary gland. 1. Medium-chain fatty-acid synthesis. *Eur. J. Biochem.* 95, 497–502 (1979a)
- GRUNNET, I., and KNUDSEN, J.: Fatty-acid synthesis in lactating-goat mammary gland. 2. Medium-chain fatty acid synthesis. *Eur. J. Biochem.* 95, 503–507 (1979b)
- Halal Control: <http://www.halalcontrol.com> (2010)
- HANSSON, I.: Effect of sex and weight on growth, feed efficiency and carcass characteristics of pigs. 1. Growth rate and feed efficiency of boars, barrows and gilts. *Swedish J. Agric. Res.* 4, 209–218 (1974)
- HANSSON, I., LUNDSTROM, K., and MALMFORS, B.: Effect of sex and weight on growth, feed efficiency and carcass characteristics of pigs. 2. Carcass characteristics of boars, barrows and gilts, slaughtered at four different weights. *Swedish J. Agric. Res.* 5, 69–80 (1975)
- HARMON, R. J.: Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77, 2103–2112 (1994)
- HAUG, S., MÜSSIG, S., und STICHS, A.: Muslimisches Leben in Deutschland. Bundesamt für Migration und Flüchtlinge: Deutsche Islam Konferenz 2010
- HOSPIDO, A., and SONESSON, U.: The environmental impact of mastitis: a case study of dairy herds. *Sci. Total Environ.* 343, 71–82 (2005)

- HU, F. B., STAMPFER, M. J., MANSON, J. E., RIMM, E., COLDITZ, G. A., ROSNER, B. A., HENNEKENS, C. H., and WILLETT, W. C.: Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women (PDF). *New Engl. J. Med.* 337, 1491–1499 (1997)
- ITAN, Y., POWELL, A., BEAUMONT, M. A., BURGER, J., and THOMAS, M. G.: The origins of lactase persistence in Europe. *PLoS. Comput. Biol.* 5, E1000491. Epub (2009)
- KATKOV, T., and GOWER, D. B.: The biosynthesis of androst-16-enes in boar testis tissue. *Biochem. J.* 117, 533–538 (1970)
- KESSEL, S., STROEHL, M., MEYER, H. H., HISS, S., SAUERWEIN, H., SCHWARZ, F. J., and BRUCKMAIER, R. M.: Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *J. Anim. Sci.* 86, 2903–2912 (2008)
- KEYSERLINGK, M. A. G. VON, SWIFT, M. L., PUCHALA, R., and SHELFORD, J. A.: Degradability characteristics of dry matter and crude protein of forages in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57, 291–311 (1996)
- KIRCHGESSNER, M.: Tierernährung. Frankfurt: DLG-Verlag 1987
- KNUDSEN, J.: Medium-chain fatty acid synthesis in lactating-rabbit mammary gland. Intracellular concentration and specificity of medium-chain acyl thioester hydrolase. *Biochem. J.* 181, 267–274 (1979)
- KRÖMKER, V.: Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene. Stuttgart: Parey in Medizinverlage Stuttgart GmbH 2007
- KÜHN, C. H., REINHARDT, F., and SCHWERIN, M.: Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell count compared to selection on conventional pedigree breeding values. *Arch. Tierz. Dummerstorf* 51, 23–32 (2008)
- LEBLANC, S. J., LISSEMORE, K. D., KELTON, D. F., DUFFIELD, T. F., and LESLIE, K. E.: Major advances in disease prevention in dairy cattle. Review. *J. Dairy Sci.* 89, 1267–1279. (2006)
- LEHNINGER, A. L.: Prinzipien der Biochemie. Berlin, New York: Walter de Gruyter 1987
- MATTHÉ, A., LEBZIE, P., HRIC, I., FLACHOWSKY, G., and SOMMER, A.: Effect of starch application into the proximal duodenum of ruminants on starch digestibility in the small and total intestine. *Arch. Tierernähr.* 55, 351–369 (2001)
- MOZAFFARIAN, D., KATAN, M. B., ASCHERIO, A., STAMPFER, M. J., and WILLETT, W. C.: Trans fatty acids and cardiovascular disease. *New Engl. J. Med.* 354, 1601–1613 (2006)
- MUSCHER, A. S., SCHRÖDER, B., BREVES, G., and HUBER, K.: Dietary nitrogen reduction enhances urea transport across goat rumen epithelium. *J. Anim. Sci.* PMID: 20581287. Epub (2010)
- OECD-FAO: Agricultural Outlook 2010–2019: Highlights (2009)
- OH, K., HU, F. B., MANSON, J. E., STAMPFER, M. J., and WILLETT, W. C.: Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 years of follow-up of the nurses' health study. *Amer. J. Epidemiol.* 161, 672–679 (2005)
- OSHINO, N., and SATO, R.: The dietary control of the microsomal stearyl CoA desaturation enzyme system in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 369–377 (1972)
- PAUL, V., GUERTLER, P., WIEDEMANN, S., and MEYER, H. H.: Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize (MON810) in relation to total dietary feed proteins in dairy cow digestion. *Transgenic. Res.* 19, 683–689 (2010)
- Pew Research Center: Mapping the Global Muslim Population. A Report on the Size and Distribution of the Worlds Muslim Population. Washington D. C.: Pew Forum on Religion & Public Life 2009
- PLACE, S. E., and MITLOEHNER, F. M. J.: Invited review. Contemporary environmental issues: a review of the dairy industry's role in climate change and air quality and the potential of mitigation through improved production efficiency. *Dairy Sci.* 93, 3407–3416 (2010)
- PRECHT, D.: Variation of trans fatty acids in milk fats. *Z. Ernährungswiss.* 34, 27–29 (1995)
- REGO, O. A., PORTUGAL, P. V., SOUSA, M. B., ROSA, H. J. D., VOUZELA, C. M., BORBA, A. E. S., and BESSA, R. J. B.: Effect of diet on the fatty acid pattern of milk from dairy cows. *Anim. Res.* 53, 213–220 (2004)
- RICROCH, A., BERGÉ, J. B., and KUNTZ, M.: Is the German suspension of MON810 maize cultivation scientifically justified? *Transgenic Res.* 19, 1–12 (2010)
- ROMAGNOLO, D., POLAN, C. E., and BARBEAU, W. E.: Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. *J. Dairy Sci.* 77, 1093–1099 (1994)
- SCHLAMBERGER, G., WIEDEMANN, S., VITURRO, E., MEYER, H. H., and KASKE, M.: Effects of continuous milking during the dry period or once daily milking in the first 4 weeks of lactation on metabolism and productivity of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 2471–2485 (2010)
- SCHWARZ, F. J., und MEYER, U. (Eds.): Optimierung des Futterwertes von Mais und Maisprodukten. Landbauforschung VTI Agriculture and Forestry Research, Sonderheft 331 (2009)
- SEEGERS, H., FOURICHON, C., and BEAUDEAU, F.: Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34, 475–491 (2003)

- SIMMONS, N. L., CHAUDHRY, A. S., GRAHAM, C., SCRIVEN, E. S., THISTLETHWAITE, A., SMITH, C. P., and STEWART, G. S.: Dietary regulation of ruminal bovine UT-B urea transporter expression and localization. *J. Anim. Sci.* 10, 3288–3299 (2009)
- SINCLAIR, P. A., and SQUIRES, E. J.: Testicular sulfoconjugation of the 16-androstene steroids by hydroxysteroid sulfotransferase: Its effect on the concentrations of 5 α -androstene in plasma and fat of the mature domestic boar. *J. Anim. Sci.* 83, 358–365 (2005)
- STEINFELD, H., GERBER, P., WASSenaar, T., CASTEL, V., ROSALES, M., and HAAN, C. DE: *Livestock's long shadow – environmental issues and options*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2006
- STEWART, G. S., GRAHAM, C., CATTELL, S., SMITH, T. P., SIMMONS, N. L., and SMITH, C. P.: UT-B is expressed in bovine rumen: potential role in ruminal urea transport. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, 605–612 (2005)
- UN: United Nation Population Reference Bureau: *Estimates and Projections*. United Nations Population Division: *World Population Prospects. The 2008 Revision* (2008)
- VITURRO, E., MEYER, H. H., GISSEL, C., and KASKE, M.: Rapid method for cholesterol analysis in bovine milk and options for applications. *J. Dairy Res.* 77, 85–89 (2010)
- VITURRO, E., KOENNING, M., KROEMER, A., SCHLAMBERGER, G., WIEDEMANN, S., KASKE, M., and MEYER, H. H.: Cholesterol synthesis in the lactating cow: Induced expression of candidate genes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 115, 62–67 (2009)
- VITURRO, E., OYA, M. DE, LASUNCIÓN, M. A., GORGOJO, L., MORENO, J. M., BENAVENTE, M., CANO, B., and GARCÉS, C.: Cholesterol and saturated fat intake determine the effect of polymorphisms at ABCG5/ABCG8 genes on lipid levels in children. *Genet. Med.* 8, 594–599 (2006)

Prof. Dr. Dr. Heinrich H. D. MEYER
Technische Universität München
Lehrstuhl für Physiologie
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Weihenstephaner Berg 3
85354 Freising-Weihenstephan
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 8161 713508
Fax: +49 8161 714204
E-Mail: physio@weihenstephan.de

Das Schwein als Modelltier in der translationalen Diabetesforschung

Simone RENNER, Christina BRAUN, Elisabeth STRECKEL
und Eckhard WOLF ML (München)

Mit 4 Abbildungen

Zusammenfassung

Translationale Medizin hat die Übertragung von Erkenntnissen aus der Grundlagenforschung in die klinische Anwendung zum Ziel. Neben Nagermodellen werden dafür Großtiermodelle, insbesondere Schweine, benötigt, die dem Menschen in Anatomie und Physiologie deutlich ähnlicher sind. Große Fortschritte in Techniken für die genetische Modifikation von Schweinen sowie die günstige Reproduktionsbiologie dieser Spezies machen das Schwein zusätzlich zu einem attraktiven Modellorganismus. Ein zentrales Anwendungsgebiet für Schweinemodelle ist die Diabetesforschung. Die Zahl der von dieser Erkrankung betroffenen Menschen steigt weltweit stetig und soll laut Hochrechnungen bis zum Jahr 2030 weit über 400 Millionen erreichen. Ein Aspekt des Typ-2-Diabetes mellitus ist die stark reduzierte Wirkung des Inkretinhormons *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP), das die Insulinsekretion glukoseabhängig potenziert. Um die Rolle der reduzierten GIP-Wirkung in der Pathogenese des Diabetes mellitus zu klären hat unsere Arbeitsgruppe transgene Schweine generiert, die einen dominant-negativen GIP-Rezeptor (GIPR^{dn}) in den Beta-Zellen des Pankreas exprimieren. GIPR^{dn}-transgene Schweine zeigen mit zunehmendem Alter eine progressive Verschlechterung der Glukosetoleranz, die mit einer Reduktion der Insulinsekretion einhergeht, sowie eine deutliche Reduktion der Beta-Zellmasse. Dieses neue Tiermodell spiegelt wichtige Aspekte des humanen Typ-2-Diabetes mellitus wider und öffnet somit neue Perspektiven für die translationale Diabetesforschung.

Abstract

Translational medicine aims at the translation of novel discoveries from basic research into clinical application. Animal models play an important role in this field. In addition to rodent models, large animals, especially pigs, are required which share numerous anatomical and physiological similarities with humans. Recent progress in techniques for the genetic modification of pigs as well as their favorable reproductive biology makes the pig an attractive model organism. Pig models are particularly important for diabetes research. The number of human patients suffering from diabetes mellitus is steadily increasing, and is predicted to exceed 400 million people worldwide by the year 2030. One aspect of type 2 diabetes mellitus is the highly reduced insulinotropic action of the incretin hormone glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) that potentiates insulin secretion in a glucose dependent manner. In order to evaluate the role of the reduced insulinotropic action of GIP in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, our group has generated transgenic pigs that express a dominant-negative GIP receptor (GIPR^{dn}) in the pancreatic beta-cells. GIPR^{dn} transgenic pigs show a deterioration of glucose tolerance with increasing age going along with reduced insulin secretion and a distinct reduction of beta-cell mass. GIPR^{dn} transgenic pigs mimic important aspects of human type 2 diabetes mellitus and thus provide novel opportunities for translational diabetes research.

1. Translationale Medizin

Die Umsetzung neuer Befunde der Grundlagenforschung in die klinische Anwendung ist ein langwieriger, kostspieliger und auch riskanter Prozess. *Translationale Medizin* ist daher ein zen-

trales Thema der Förderpolitik im Bereich der biomedizinischen Forschung. Ein entscheidender Faktor in diesem Zusammenhang ist die Verfügbarkeit von Tiermodellen, die im Hinblick auf die Wirksamkeit und Sicherheit neuer Therapieverfahren prädiktiv sind. Bislang werden dafür meist Nagermodelle verwendet, da sie im Hinblick auf Genetik und Umweltfaktoren sehr gut standardisiert werden können. Zudem steht ein umfangreiches Spektrum an Technologien zur genetischen Modifikation zur Verfügung, mit dem insbesondere Mausmodelle speziell für die jeweilige Fragestellung entwickelt werden können. Aufgrund ihrer geringen Größe und Lebenserwartung, aber auch aufgrund teilweise großer anatomischer und physiologischer Unterschiede im Vergleich zum Menschen sind Nagermodelle allein für die *Translationale Medizin* nicht ausreichend. Je nach zu untersuchender Krankheitsentität finden sich unter den Haustierarten hervorragend geeignete Modelle, um die „translationale Lücke“ zwischen Mensch und Maus zu schließen. Beispiele sind Pendants menschlicher monogenetischer Erkrankungen, die in zunehmender Zahl bei verschiedenen Haustierarten entdeckt werden. So kann zum Beispiel die beim Chianina-Rind vorkommende kongenitale Pseudomyotonie als Modell für die humane Brody-Myopathie gesehen werden. Bei beiden Erkrankungen liegt eine Mutation im *ATP2A1*-Gen vor, welche zu einem Funktionsverlust des SERCA1-Proteins führt (DRÖGEMÜLLER et al. 2008). Die Polyneuropathie von juvenilen Hunden der Rasse Greyhound zeigt eine sehr ähnliche klinische Symptomatik wie die genetisch heterogene Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung des Menschen (DRÖGEMÜLLER et al. 2010). Schweine, die eine Spontanmutation im *LDL-Rezeptor*-Gen (*Low-density-lipoprotein-receptor*-Gen) tragen, sind als Atherosklerosemodell geeignet (HASLER-RAPACZ et al. 1998). Neben diesen zufälligen Übereinstimmungen können heute jedoch auch Großtiermodelle, insbesondere Schweine, für bestimmte Fragestellungen der translationalen Forschung gezielt erstellt werden. Ausgangspunkt dafür ist in der Regel ein genetischer und/oder pathophysiologischer Befund in einem Patientenkollektiv, der kausal für die Entwicklung einer Krankheit oder mit dieser assoziiert ist. Effiziente Gentransferverfahren, wie die Verwendung lentiviraler Vektoren oder die Kerntransferklonierung mit genetisch modifizierten Spenderzellen, ermöglichen es, die der menschlichen Erkrankung zugrundeliegenden Veränderungen auf molekularer Ebene zu rekonstruieren (Abb. 1). Genetisch modifizierte Schweinemodelle wurden bislang für neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer und Morbus Huntington, für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie für die Diabetesforschung generiert (Übersicht in AIGNER et al. 2010). Auch in der Xenotransplantation spielen genetisch veränderte Schweine bereits eine wichtige Rolle (KLYMIUK et al. 2010). Die Entwicklung solcher maßgeschneiderter Tiermodelle entspricht der Forderung nach einem „Refinement“ der tierexperimentellen Forschung.

2. Mensch – Schwein: Ähnlichkeiten und Unterschiede

Tiermodelle sind essentiell in der Diabetesforschung, vor allem für Studien zur Ätiologie und Pathogenese sowie für die Entwicklung neuer wirksamer Medikamente. Obwohl bereits eine große Anzahl gut charakterisierter und auch vielseitig einsetzbarer Mausmodelle etabliert wurde, liefern Großtiermodelle dennoch eine sehr sinnvolle Ergänzung beziehungsweise eine Verbesserung der experimentellen Möglichkeiten, um das Wissen über die entsprechenden humanen Erkrankungen zu erweitern.

Insbesondere das Schwein erscheint in vielerlei Hinsicht als äußerst geeignetes Modell für die menschliche Physiologie und Pathophysiologie (DOUGLAS 1972). Gemeinsamkeiten zwi-

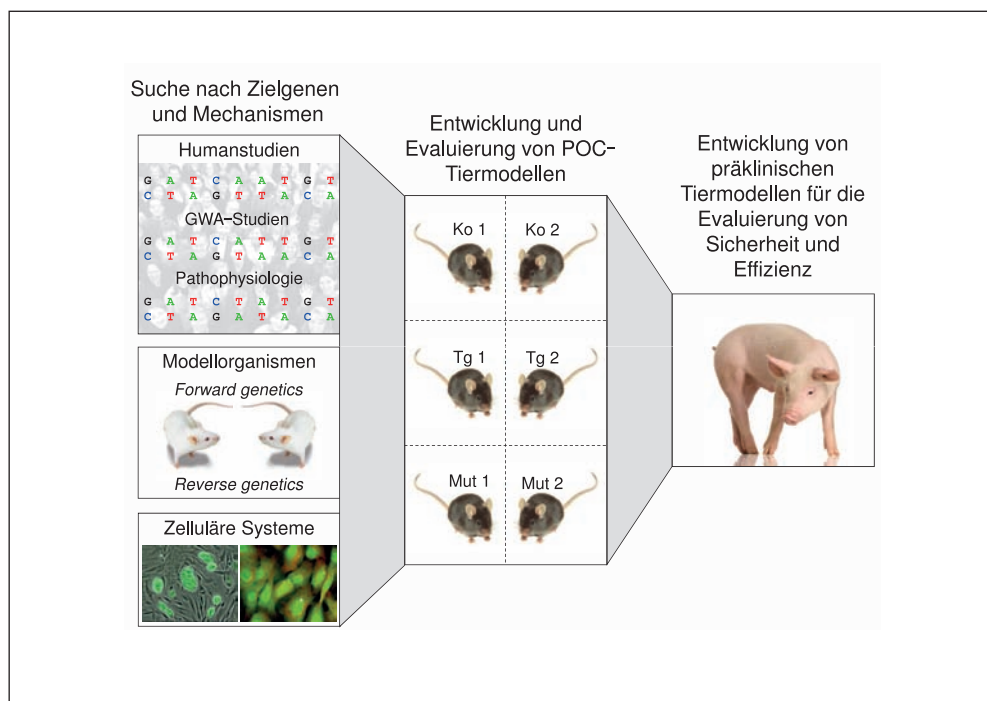


Abb. 1 Entwicklung von verbesserten präklinischen Tiermodellen. Für bestimmte Zielgene und Mechanismen, die aus unterschiedlichen Pipelines identifiziert wurden (links), können gezielt Mausmodelle für *Proof-of-Concept*-Studien erstellt werden. Auf der Basis der Erkenntnisse aus den Mausmodellen werden spezielle Großtiermodelle, wie z. B. genetisch modifizierte Schweine, entwickelt (AIGNER et al. 2010).

schen Mensch und Schwein hinsichtlich Aufbau und Funktion des Gastrointestinaltrakts, Morphologie des Pankreas, Pharmakokinetik sowie Struktur und Funktion des Insulins lassen das Schwein geradezu ideal erscheinen für die Diabetesforschung (LARSEN und ROLIN 2004). Auch Körpergröße und Gewicht sind für die menschliche Physiologie wesentlich repräsentativer als dies bei Nagern Modellen der Fall ist. Deshalb können am Schwein entwickelte neue diagnostische oder chirurgische Verfahren oft direkt auf die Humanmedizin übertragen werden.

Das porzine Pankreas ähnelt dem des Menschen in Größe, Form und Lage sehr stark, trotz einiger anatomischer Unterschiede im Ausführungsgangsystem (MURAKAMI et al. 1997). Die endokrinen Zellen liegen sowohl beim Menschen als auch beim Schwein vorwiegend in den Langerhansschen Inseln und vereinzelt oder in kleineren Zellkonglomeraten im exokrinen pankreatischen Gewebe. Die Beta-Zellen stellen mit ca. 80 % den vorherrschenden Zelltyp der Pankreasinseln dar (LARSEN und ROLIN 2004).

Die Alpha-Zellen sind vor allem in der Peripherie der Langerhansschen Inseln des dorsalen Pankreas lokalisiert, wohingegen PP-Zellen bei beiden Spezies fast ausschließlich im ventralen Pankreas vorkommen (WIECZOREK et al. 1998). Darüber hinaus entsprechen sich Größe und Struktur der Langerhansschen Inseln im pankreatischen Gewebe adulter Individuen. Aufgrund der deutlicher ausgeprägten retikulären Kapsel zwischen endokrinen und exokrinen Anteilen des Pankreas und der Formation größerer Inselapparate werden ältere

Schweine für die Inselisolation sowie als Ressource für die Inseltransplantation favorisiert (ORCI et al. 1979, JAY et al. 1999).

Die Aminosäuresequenz des humanen Insulins unterscheidet sich von der des porzinen Insulins nur in einer Aminosäure an Position 30 der B-Kette (SONNENBERG und BERGER 1983). Die Aminosäuresequenz von humanem und porzinem GIP stimmt bis auf einen Aminosäureaustausch an Position 18 (His → Arg) und Position 34 (Asn → Ser) überein (MOODY et al. 1984).

Das Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) wird bei beiden Spezies zusammen mit Insulin in den Granula der Beta-Zellen gespeichert und sezerniert. Dieser Vorgang setzt bereits in der Frühphase der Ontogenese in pluripotenten, endokrinen Stammzellen ein (LUKINIUS et al. 1996). Allerdings zeigt das Schwein im Gegensatz zum Menschen keine Ablagerung von zytotoxischen Amyloidplaques mit konsekutiver Steigerung der Apoptoserate der Beta-Zellen. Grund dafür ist die beim menschlichen IAPP vorhandene amyloidogene Aminosäuresequenz von Position 20 bis 29 (CLARK et al. 1988, TURNER et al. 1988, POTTER et al. 2010). Diese amyloidogene Sequenz des IAPP konnte auch bei der Hauskatze sowie beim Cynomolgusaffen (*Macaca fascicularis*) nachgewiesen und in Zusammenhang mit einem spontan auftretenden Diabetes mellitus, ähnlich dem humanen Diabetes Typ 2, mit Ablagerung unlöslicher Amyloidfibrillen gebracht werden (O'BRIEN et al. 1993, HOENIG et al. 2000, O'BRIEN et al. 1996).

Trotz anatomischer Unterschiede im Gastrointestinaltrakt gibt es eine Vielzahl funktioneller Entsprechungen hinsichtlich der Physiologie der Verdauung (Ingestapassagezeit und Effektivität der Verdauung) und der Nahrungsbedürfnisse (MILLER und ULLREY 1987).

Das Schwein ernährt sich wie der Mensch omnivor und ist in besonderem Maße abhängig von der Qualität der zugeführten Nahrung, da Umbauprozesse der Nahrungsmoleküle durch symbiotische Mikroorganismen im Darm eine untergeordnete Rolle spielen (HUGE et al. 1995). Das Schwein und der Mensch zeigen gleichermaßen eine starke Korrelation zwischen der Beta-Zellmasse und einer ungestörten Funktion der metabolischen Kontrollmechanismen, beziehungsweise der Beta-Zellfunktion. Durch gute Kompensationsmechanismen kommt es bei beiden Spezies erst bei einer Reduktion der Beta-Zellmasse um 80 % zu einem klinisch manifesten Diabetes mellitus. Somit ist das Schwein ein ausgezeichnetes Modell für den Glukosemetabolismus des Menschen. Die schnelle, ausgeprägte postmortale Autolyse des pankreatischen Gewebes schränkt die Verfügbarkeit humaner Gewebeproben bei der pathologischen Untersuchung und somit die Erstellung repräsentativer Studien stark ein (BUTLER et al. 2003). Die Durchführung von physiologischen Tests, wie dem Glukosetoleranztest mit anschließender quantitativ-stereologischer Evaluierung der Beta-Zellmasse *post mortem* am Schweinemodell vermittelt somit Kenntnisse der Inselmorphologie, der Relation zwischen Beta-Zellmasse und Beta-Zellfunktion und eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Diagnosemethoden in der Humanmedizin (LARSEN et al. 2003).

Die metabolische Anpassung beim Abfall des Blutglukosespiegels und des Insulingehalts während einer Fastenperiode, die beim Schwein einen Anstieg der freien Fettsäuren sowie von Glycerol durch Oxidation körpereigener Fettreserven, verstärkte Glukoneogenese und Ketonkörperbildung zur Folge hat, ist nahezu identisch mit den Vorgängen beim Menschen.

Die Glukose- und Insulinplasmaspiegel steigen mit zunehmendem Alter, vermutlich durch eine zunehmende periphere Insulinresistenz und reduzierte Beta-Zellfunktion, wohingegen die Glukosetoleranz abhängig vom allgemeinen Gesundheitsstatus und vom Körpergewicht bei beiden Spezies mit dem Alter sinkt (ROSENTHAL et al. 1982, LARSEN et al. 2003). Die physiologischen Blutglukosespiegel sind im Generellen bei Mensch und Schwein vergleichbar (Schwein: 70–115 mg/dl; Mensch: 70–100 mg/dl), wohingegen das Göttinger Minipig

deutlich niedrigere Plasmaglukosewerte zeigt (KRAFT und DÜRR 2005, CLASSEN et al. 2004, LARSEN und ROLIN 2004).

Durch die ähnliche Beschaffenheit der Haut und des subkutanen Gewebes und die dadurch vergleichbare transdermale Permeabilität kann das Schwein sehr gut zur Evaluierung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik nach einer subkutanen Injektion von Medikamenten genutzt werden (MEYER 1996, BENECH-KIEFFER et al. 2000, QVIST et al. 2000). Des Weiteren gibt es entscheidende Entsprechungen in der Biotransformation von Medikamenten durch eine ähnliche Cytochrom-p450-Oxidase-Konzentration in der Leber. Obgleich es einige Unterschiede im Vergleich zum Menschen gibt, ist das Schwein ein sehr bedeutendes Modell in der pharmakologischen Forschung (MONSHOUWER und WITKAMP 2000).

Diabetes mellitus wurde beim Schwein bisher zum einen durch die Pankreatektomie verursacht. Da bei dieser sehr invasiven Methode auch der exokrine Teil des Pankreas entfernt wird, kommt es zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung der Verdauung. Zum anderen wurde die Krankheit durch Applikation von Streptozotocin (1-Methyl-1-Nitrosoharnsäure) induziert. Streptozotocin bindet an das Kohlenstoffatom in Position 2 des D-Glukosemoleküls und wird somit durch den GLUT2-Rezeptor in die Beta-Zellen transportiert. In Folge kommt es zu DNA-Strangbrüchen und zur Induktion von DNA-Reparaturmechanismen (LENZEN 2008). Der dadurch gesteigerte ATP-Verbrauch führt schließlich zum Untergang der Beta-Zellen mit konsekutivem Insulinmangel und schnellem Anstieg des Blutglukosespiegels (LENZEN 2008). Im Schweinmodell ist die Wirkung von Streptozotocin jedoch sehr variabel (LEDOUX und WILSON 1984, ELSNER et al. 2000).

Die Etablierung und Charakterisierung klinisch relevanter, genetisch modifizierter Schweinemodelle stellt somit eine entscheidende Verbesserung dar und bietet vielfältige neue Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien und Präventionsmaßnahmen.

3. Diabetes mellitus – ein globales Problem

Unter der Bezeichnung Diabetes mellitus wird eine heterogene Gruppe metabolischer Erkrankungen zusammengefasst, die mit einem Anstieg des Blutglukosespiegels, Polyurie, Polydipsie und bei Entgleisung der Stoffwechsellage mit metabolischer Ketoazidose einhergehen (*American Diabetes Association* 2010). Die Ätiologie dieser Erkrankung ist sehr komplex und bisher nicht vollständig wissenschaftlich geklärt. Grundsätzlich werden zwei große Gruppen unterschieden:

- Beim Diabetes mellitus Typ 1 handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung. Immunmedierte, entzündliche Prozesse des endokrinen Pankreas und die dadurch bedingte Zerstörung des pankreatischen Inselapparats haben eine insuffiziente Insulinsekretion und einen absoluten Insulinmangel zur Folge.
- Diabetes mellitus Typ 2 ist mit über 90 % der Fälle weitaus häufiger. Genetische Prädisposition in Kombination mit Übergewicht durch jahrelange hyperkalorische Ernährung und Bewegungsmangel erhöhen das Risiko für die Dysregulation der Glukosehomöostase und für klinisch manifesten Diabetes mellitus (LEAHY 2005). Der Organismus reagiert als positive Anpassungsreaktion in der frühen Latenzphase mit einer vermehrten Synthese und Sekretion von Insulin. Das erhöhte Insulinangebot führt zu einer Senkung der Rezeptordichte und somit durch die periphere Insulinresistenz der Zielzellen zu einem relativen Insulinmangel. Die Konsequenz nach Erschöpfung der Kompensationsmechanismen ist die gesteigerte

Apoptoserate der pankreatischen Beta-Zellen und dadurch die progressive Reduktion der Beta-Zellmasse mit Hypoinsulinämie und klinischer Manifestation des Diabetes mellitus (BUTLER et al. 2003, LEAHY 2005).

In einigen Fällen des humanen, juvenilen Diabetes mellitus liegt keine autoimmune Genese zugrunde, vielmehr handelt es sich um monogenetisch bedingte Erkrankungen (EDGHILL et al. 2006). Eine ausgeprägte Beta-Zelldysfunktion mit Insulinmangel und Glukoseintoleranz in einem sehr frühen Lebensalter sind charakteristisch für diese monogenetischen Formen des Diabetes mellitus. Schwere Verläufe von diabetischer Ketoazidose und Hyperglykämie mit dramatischem Gewichtsabfall sind die Folge (STOY et al. 2007).

Eine Gruppe genetischer Defekte (*HNF-1 α* , *HNF-4 α* , *HNF-1 β* , *PDX*, *GCK*, *NeuroD1*), die zu Störungen der Beta-Zellfunktion führen, wird unter dem Überbegriff MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) klassifiziert (American Diabetes Association 2010). Mutationen im Insulinrezeptorgen (Leprechaunismus, Rabson-Mendenhall-Syndrom) und heterozygote Mutationen im humanen Insulingen (C43G, C96Y, R89C, G90C usw.) führen ebenfalls zu diesem Krankheitsbild (STOY et al. 2007).

Des Weiteren können rezidivierende Pankreatitiden, Traumata, Neoplasien des endokrinen und des exokrinen Pankreas und die hormonell bedingte diabetogene Stoffwechsellage in Folge bestimmter Endokrinopathien (Hyperthyreoidismus, Cushing-Syndrom, Phäochromozytom usw.) ursächlich für Diabetes mellitus sein (American Diabetes Association 2010).

Der demographische Wandel, Bewegungsarmut, übermäßige und ungesunde Ernährung werden nach Hochrechnung bis zum Jahr 2030 zu einer explosionsartigen Zunahme der Prävalenz von Diabetes mellitus in der Gesamtweltbevölkerung führen. Man rechnet damit, dass bis zum Jahr 2030 die Anzahl an Diabetes mellitus erkrankter Personen zwischen 20 und 79 Jahren weltweit von 285 Millionen auf 439 Millionen ansteigen wird (SHAW et al. 2010). Das bedeutet eine Zunahme von 20 % in Industriestaaten sowie von besorgniserregenden 68 % in Entwicklungsländern (WILD et al. 2004, SHAW et al. 2010). Allerdings basieren diese Angaben auf der Annahme, dass die Wirkung anderer Risikofaktoren konstant bleibt. Möglicherweise werden daher die Schätzungen zur Diabetesprävalenz noch übertroffen werden (WILD et al. 2004). Hinzu kommt die enorme wirtschaftliche Belastung der Gesundheitssysteme durch diese Erkrankung. Wegen des chronischen Charakters und der schweren Folgeerkrankungen rechnet man bis zum Jahr 2030 mit einer Verdoppelung der Kosten. Man geht davon aus, dass die Gesamtkosten für die Versorgung von Diabetespatienten allein in den USA von \$ 174 Milliarden im Jahr 2007 bis zum Jahr 2034 auf \$ 336 Milliarden zunehmen werden (TAO et al. 2010).

Aus diesen Gründen bedarf es in den kommenden Jahren international koordinierter Forschungsaktivitäten zur Klärung von Ätiologie und Pathogenese der verschiedenen Diabetesformen, um die Grundlagen für Präventionsstrategien und die Entwicklung neuer Diagnose- und Behandlungsmethoden zu schaffen.

4. Inkretine und Inkretinhormon-basierte Therapeutika

Bislang sind zwei körpereigene Inkretinhormone bekannt: *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP) und *Glucagon-like Peptide-1* (GLP-1). Beide Inkretinhormone vermitteln neben anderen Aufgaben den sogenannten Inkretineffekt. Dieser beschreibt das Phänomen, dass oral verabreichte Glukose im Vergleich zu einer isoglykämischen, intravenösen Glukose-

infusion zu einer höheren Insulinsekretion führt (NAUCK et al. 1993a). Das erste Inkretinhormon wurde Ende der 1960er Jahre entdeckt (BROWN et al. 1969). Aufgrund seiner Fähigkeit, die Magensäureproduktion bei Hunden zu hemmen, wurde es zunächst als *Gastric Inhibitory Polypeptide* (GIP) bezeichnet (BROWN 1971, BROWN und DRYBURGH 1971, BROWN et al. 1975). Bei weiteren Untersuchungen wurde zusätzlich festgestellt, dass GIP auch in der Lage ist, die Insulinsekretion zu steigern. Daraufhin wurde es in *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* umbenannt, da eine Steigerung der Insulinsekretion durch physiologische GIP-Konzentrationen erreicht werden konnte, während für eine Hemmung der Magensäureproduktion pharmakologische GIP-Konzentrationen nötig waren. Die Abkürzung GIP wurde beibehalten (DUPRE et al. 1973). Im Zuge von Analysen des Proglukagon-Gens wurde das zweite Inkretinhormon, *Glucagon-like Peptide-1* (GLP-1), mit starker insulinotroper Wirkung entdeckt (SCHMIDT et al. 1985).

GLP-1 ist ein gewebespezifisches, posttranslationales, proteolytisches Produkt des Proglukagon-Gens und kommt beim Menschen hauptsächlich in zwei trunkierten Formen, GLP-1(7-36)-Amid und GLP-1(7-37), vor. Beide bioaktiven Formen werden im Bezug auf ihre insulinotrope Wirkung als äquipotent eingeschätzt. GIP besteht aus 42 Aminosäuren und entsteht aus dem proGIP-Vorläufermolekül (TAKEDA et al. 1987). Beide Inkretinhormone werden von endokrinen Zellen im Darm sezerniert, GLP-1 von L-Zellen im distalen Ileum und Kolon, GIP von K-Zellen im Duodenum und proximalen Jejunum (MOJSOV et al. 1986, EISSELE et al. 1992). Die Sekretion der Inkretinhormone wird durch Aufnahme von Nährstoffen (vor allem Kohlenhydrate und Fett), neurale und endokrine Faktoren stimuliert (BRUBAKER und DRUCKER 2004, BAGGIO und DRUCKER 2007). Über die Blutbahn gelangen GIP und GLP-1 zum Pankreas, wo sie an ihren jeweiligen spezifischen Rezeptor binden, den GIP-Rezeptor (GIPR) und den GLP-1-Rezeptor (GLP-1R). Über verschiedene intrazelluläre Mechanismen kommt es durch verstärkte Exozytose Insulin enthaltender Granula in den Beta-Zellen zur Stimulation der Insulinsekretion. Zusätzlich werden die Transkription des Insulingens sowie die Insulinbiosynthese stimuliert (DING und GROMADA 1997, BAGGIO und DRUCKER 2007).

Von beiden Inkretinen ist aus Studien an INS-1-Zellen sowie aus Nagermodellen ein proliferativer und anti-apoptotischer Effekt auf die Beta-Zellen des Pankreas bekannt (TRUMPER et al. 2001, FARILLA et al. 2002, 2003, LI et al. 2003, MAIDA et al. 2009), was sie für die Diabetestherapie überaus interessant macht.

GLP-1 hat jedoch eine besonders kurze Halbwertszeit von 1–1½ min. GIP besitzt eine längere Halbwertszeit von ca. 7 min (VILSBOLL et al. 2006). GIP und GLP-1 werden durch das Enzym Dipeptidyl-Peptidase-4 (DPP-4) abgebaut (DEACON et al. 1995).

Neben den Funktionen im Pankreas entfalten beide Inkretine weitere Wirkungen in anderen Zielgeweben.

GLP-1 besitzt kardioprotektive sowie neuroprotektive Wirkungen, fördert die Glukoseaufnahme und -speicherung in Skelettmuskulatur und Fettgewebe, senkt die Glukoneogenese in der Leber, mindert den Appetit und verringert die Magenentleerung (BAGGIO und DRUCKER 2007). GIP erfüllt noch weitere biologische Funktionen im Fettgewebe, in Knochen und dem zentralen Nervensystem (BAGGIO und DRUCKER 2007).

Im Hinblick auf die Krankheit Diabetes mellitus ist die Untersuchung der Inkretinhormone besonders interessant, da Typ-2-Diabetes-Patienten einen stark verminderten Inkretineffekt zeigen (NAUCK et al. 1986). Die Ursache für diese Veränderung ist in der Sekretion sowie dem insulinotropen Effekt der Inkretinhormone beim Typ-2-Diabetes-Patienten zu suchen. Die Sekretion von GIP scheint bei diesen Patienten ähnlich zu sein wie beim gesunden

Menschen (TOFT-NIELSEN et al. 2001, VILSBOLL et al. 2001). Obwohl ältere Studien vor allem zwei Stunden nach Nahrungsaufnahme eine geringgradig verminderte Sekretion von GLP-1 beim Typ-2-Diabetes-Patienten beschrieben (TOFT-NIELSEN et al. 2001, VILSBOLL et al. 2001), zeigen neuere Untersuchungen eine normale Sekretion im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (VOLLMER et al. 2008).

Die insulinotrope Wirkung von GLP-1 scheint beim Typ-2-Diabetes-Patienten erhalten zu sein, die insulinotrope Wirkung von GIP ist dagegen deutlich reduziert (NAUCK et al. 1993b). Als Ursachen für die verminderte insulinotrope Wirkung von GIP wurden die Desensibilisierung des GIPR, eine verminderte Expression des GIPR sowie Mutationen im *GIPR*-Gen diskutiert (TSENG et al. 1996, ALMIND et al. 1998, LYNN et al. 2001, 2003). Kürzlich konnte in einer Metaanalyse von neun genomweiten Assoziationsstudien gezeigt werden, dass Variationen im *GIPR*-Gen die Glukosetoleranz sowie die Insulinsekretion nach oraler Glukose-Challenge beeinflussen (SAXENA et al. 2010).

Die Erkenntnis, dass der insulinotrope Effekt von GLP-1 bei Typ-2-Diabetes-Patienten erhalten ist, führte zu der Idee, Therapeutika auf der Basis von GLP-1 zu entwickeln. Durch die Anwendung von Inkretinhormon-basierten Therapeutika sollen eine gesteigerte Insulinsekretion und damit konstantere Blutglukosespiegel erreicht werden. Da GLP-1 eine sehr kurze Halbwertszeit von nur 1–1½ min hat (DEACON et al. 1995), ist es nicht praktikabel, natives GLP-1 als Therapeutikum zu verwenden. Deshalb wurden zum einen GLP-1-Rezeptor-Agonisten entwickelt, wobei durch Modifikationen am N-Terminus oder am C-Terminus eine DPP-4-Resistenz oder eine Umgehung der renalen Filtration erreicht werden konnte. So konnte die Halbwertszeit deutlich verlängert werden. Zum anderen wurden DPP-4-Inhibitoren entwickelt, die das Enzym Dipeptidyl-Peptidase-4 hemmen, wodurch die Halbwertszeit der endogenen Inkretinhormone verlängert werden kann (GREEN et al. 2004, 2006, GREEN und FLATT 2007). Sowohl GLP-1-Rezeptor-Agonisten wie auch DPP-4-Inhibitoren sind bereits für die Therapie zugelassen. Beispiele für GLP-1-Rezeptor-Agonisten sind Byetta® (Exenatide) und Victoza® (Liraglutide), während als Vertreter bereits zugelassener DPP-4-Inhibitoren Galvus® (Vildagliptin) und Januvia® (Sitagliptin) zu nennen sind (AHREN 2007, 2009).

Exenatide kam als erstes Inkretin-Mimetikum im Jahr 2005 in den Vereinigten Staaten und 2007 in Europa unter dem Namen Byetta® auf den Markt. Im Gegensatz zu nativem GLP-1 beträgt die mittlere terminale Halbwertszeit ca. 2,4 h (EDWARDS et al. 2001). Zahlreiche Studien zeigten positive Effekte von Exenatide: Eine signifikante Verbesserung der Kontrolle des Blutglukosespiegels (BUSE et al. 2004, DEFRONZO et al. 2005, KENDALL et al. 2005), eine Senkung des HbA1c (HEINE et al. 2005), Gewichtsverlust (BUSE et al. 2004, DEFRONZO et al. 2005, KENDALL et al. 2005) sowie positive Auswirkungen auf den Blutdruck und die Blutlipidwerte (KLONOFF et al. 2008). Ähnliche Ergebnisse konnten infolge einer Behandlung mit Liraglutide festgestellt werden (GARBER et al. 2009, MARRE et al. 2009, NAUCK et al. 2009). DPP-4 Inhibitoren bewirkten eine Senkung des Blutglukosespiegels (AHREN et al. 2002).

Im Nagermodell konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Exenatide sich positiv auf die Beta-Zellmasse im Pankreas auswirkt (SAKURABA et al. 2002, PARK et al. 2008). Die Regenerationskapazität des Nagerpankreas wird jedoch im Vergleich zum humanen Pankreas deutlich höher eingeschätzt (MEHNERT 2003). Beim Typ-2-Diabetes-Patienten sind Auswirkungen von Byetta® auf die Beta-Zellmasse noch nicht untersucht, da bislang keine dafür geeigneten *In-vivo*-Imagingverfahren zur Verfügung stehen. Therapiestudien am Großtiermodell Schwein, das dem Menschen hinsichtlich Proliferationsfähigkeit des endokrinen Pan-

kreas und für das Imaging relevanter Parameter ähnlicher ist als die Maus, könnten für diese Frage wichtige Erkenntnisse liefern.

Exenatide muss noch zweimal täglich subkutan injiziert werden, Liraglutide bereits nur noch einmal täglich. Neue Entwicklungen im Bereich der Inkretinmimetika könnten bald die Anwendung einmal wöchentlich ermöglichen (CHRISTENSEN und KNOP 2010) und damit die Patienten-Compliance erhöhen.

5. GIPR^{dn}-transgenes Schweinmodell

Um die pathophysiologischen Konsequenzen der reduzierten GIP-Wirkung beim Typ-2-Diabetiker zu untersuchen, haben wir ein genetisch modifiziertes Schweinmodell entwickelt, das einen dominant-negativen GIPR (GIPR^{dn}) in den pankreatischen Beta-Zellen exprimiert. Dieser unterscheidet sich vom endogenen GIPR durch eine Deletion von acht Aminosäuren (Aminosäureposition 319–326/Nukleotidposition 955–978) und zwei Punktmutationen (Aminosäureposition 340/Nukleotidposition 1018–1020), was zu einem Austausch der Aminosäure Alanin durch Glutaminsäure in der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors führt. Die dritte intrazelluläre Schleife ist essentiell für die Signaltransduktion (CYPESS et al. 1999, SALAPATEK et al. 1999, LINDGREN et al. 2000, HARMAR 2001). Das Inkretinhormon GIP bindet mit etwa der gleichen Affinität an den GIPR^{dn} wie an den endogenen GIPR. Die Bindung an den GIPR^{dn} führt jedoch zu keiner Signalübermittlung (HERBACH et al. 2005). Somit konkurriert der GIPR^{dn} mit dem endogenen GIPR um den Liganden GIP, was eine Reduktion der insulinotropen Wirkung von GIP zur Folge hat. So wird die Situation, die beim Typ-2-Diabetes-Patienten beobachtet wird, nachgeahmt. GIPR^{dn}-transgene Schweine wurden mittels lentiviralem Gentransfer generiert (RENNER et al. 2010).

Der lentivirale Vektor bestand aus der cDNA des humanen GIPR^{dn} unter Kontrolle des *Ins2*-Gen-Promotors aus der Ratte. Die lentiviralen Partikel wurden in den perivitellinen Raum von Schweinezygoten injiziert und anschließend mittels laparoskopischem Embryotransfer in die Eileiter von zyklussynchronisierten Empfängertieren übertragen. Mittels PCR und *Southern-Blot*-Analysen fand nach der Geburt eine Genotypisierung der Tiere statt. Es konnten neun transgene *Founder*-Tiere identifiziert werden. Die Expression von GIPR^{dn}-mRNA konnte in isolierten Langerhansschen Inseln erfolgreich mittels RT-PCR nachgewiesen werden (RENNER et al. 2010).

GIPR^{dn}-transgene Schweine entwickelten sich normal, Blutglukosespiegel sowie Serumfruktosaminwerte waren im Normalbereich. Bis zu einem Alter von mindestens 24 Monaten entwickelten die Tiere keinen klinischen Diabetes mellitus (RENNER et al. 2010).

In verschiedenen physiologischen Tests sowie quantitativ-stereologischen Untersuchungen zeigten sich jedoch deutliche Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe: Um herauszufinden, ob die Expression des GIPR^{dn} spezifisch die insulinotrope Funktion von GIP reduziert, wurden ein GIP- sowie ein Exendin-4-Stimulationstest durchgeführt. Nach intravenöser Bolusgabe von GIP war erkennbar, dass der insulinotrope Effekt dieses Inkretinhormons vermindert war (Abb. 2A). Im Gegensatz dazu war die Insulinsekretion nach intravenöser Bolusgabe von Exendin-4 bei GIPR^{dn}-transgenen Schweinen im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich erhöht (Abb. 2B), was zu einem schnelleren Abfall der Blutglukosespiegel führte. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Funktion des GLP-1-Rezeptors bei GIPR^{dn}-transgenen Schweinen im Gegensatz zum GIPR nicht beeinträchtigt ist und eventuell sogar kompensatorisch hyperaktiv sein könnte.

(RENNER et al. 2010). Durch immunohistochemische Färbungen sowohl des GIPR als auch des GLP-1R konnte kein deutlicher Unterschied im Expressionslevel des GIPR oder GLP-1R bei GIPR^{dn}-transgenen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren dargestellt werden. Auch die räumliche Verteilung der beiden Rezeptoren in den Langerhansschen Inseln des Pankreas war bei beiden Tiergruppen gleich (Abb. 2C/D) (RENNER et al. 2010).

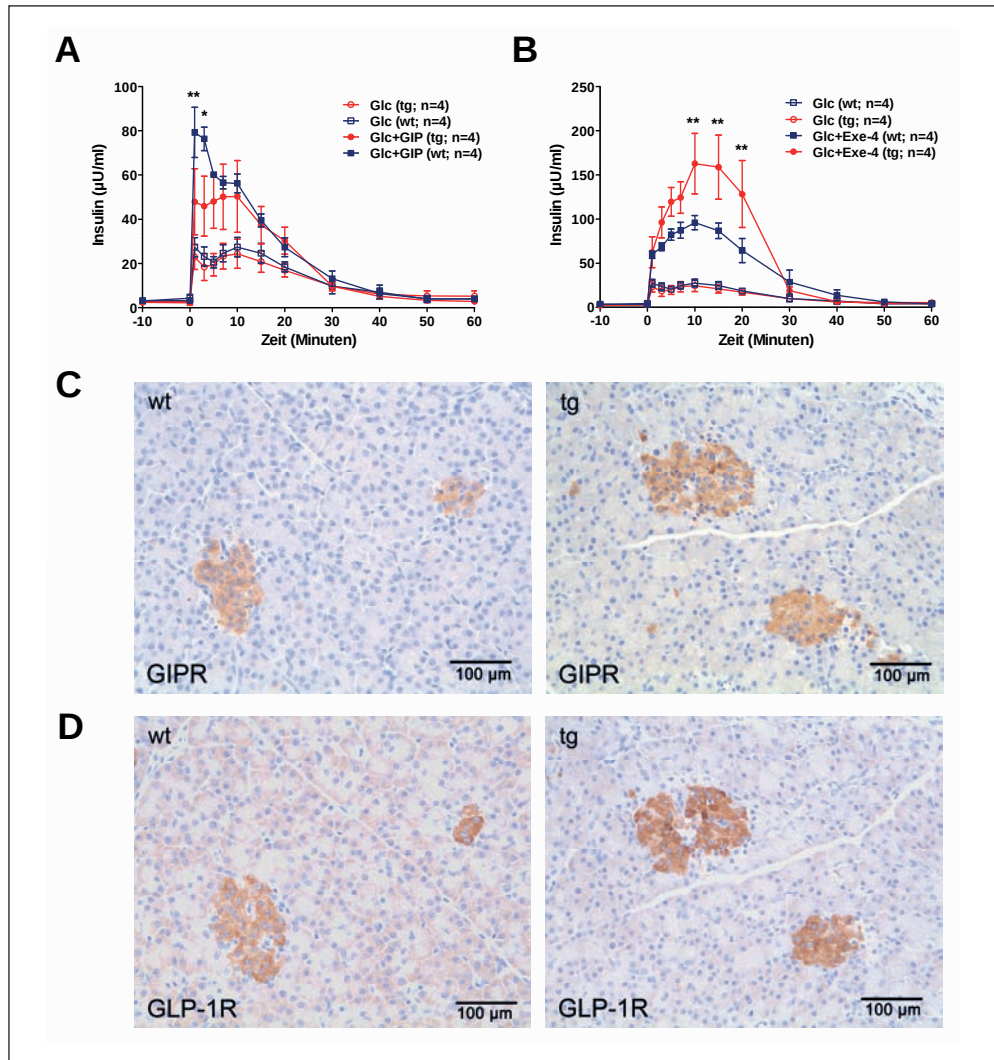


Abb. 2 Verminderte insulinotrope GIP-Wirkung, jedoch erhöhte insulinotrope Wirkung von Exendin-4 bei 11 Wochen alten GIPR^{dn}-transgenen Schweinen im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren. (A, B) Seruminsulinspiegel von GIPR^{dn}-transgenen Tieren (tg) sowie Kontrolltieren (wt) nach intravenöser Gabe von Glukose ± GIP (A) oder Glukose ± Exendin-4 (B); (C, D) Immunohistochemische Färbungen des GIPR (C) und des GLP-1R (D) in Pankreasschnitten von 11 Wochen alten GIPR^{dn}-transgenen Tieren (tg) und Kontrolltieren (wt), es zeigt sich keine Veränderung in Menge und Verteilung des GIPR/GLP-1R zwischen beiden Gruppen (RENNER et al. 2010).

Auffälligkeiten zeigten sich jedoch bei der Glukosetoleranz und Insulinsekretion von GIPR^{dn}-transgenen Schweinen im Vergleich zu Kontrolltieren. Ein oraler Glukosetoleranztest (OGTT) wurde bei 11 Wochen und 5 Monate alten GIPR^{dn}-transgenen Schweinen und nicht transgenen Kontrolltieren durchgeführt. GIPR^{dn}-transgene Tiere zeigten im Alter von 11 Wochen im OGTT deutlich höhere Blutglukosespiegel sowie eine verzögerte Insulinsekretion, wohingegen die Gesamtinsulinsekretion keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen aufwies (Abb. 3A/B). Im Alter von 5 Monaten konnte eine verminderte Glukosetoleranz aufgrund einer signifikant verminderten Insulinsekretion bei den GIPR^{dn}-transgenen Tieren festgestellt werden (Abb. 3C/D) (RENNER et al. 2010).

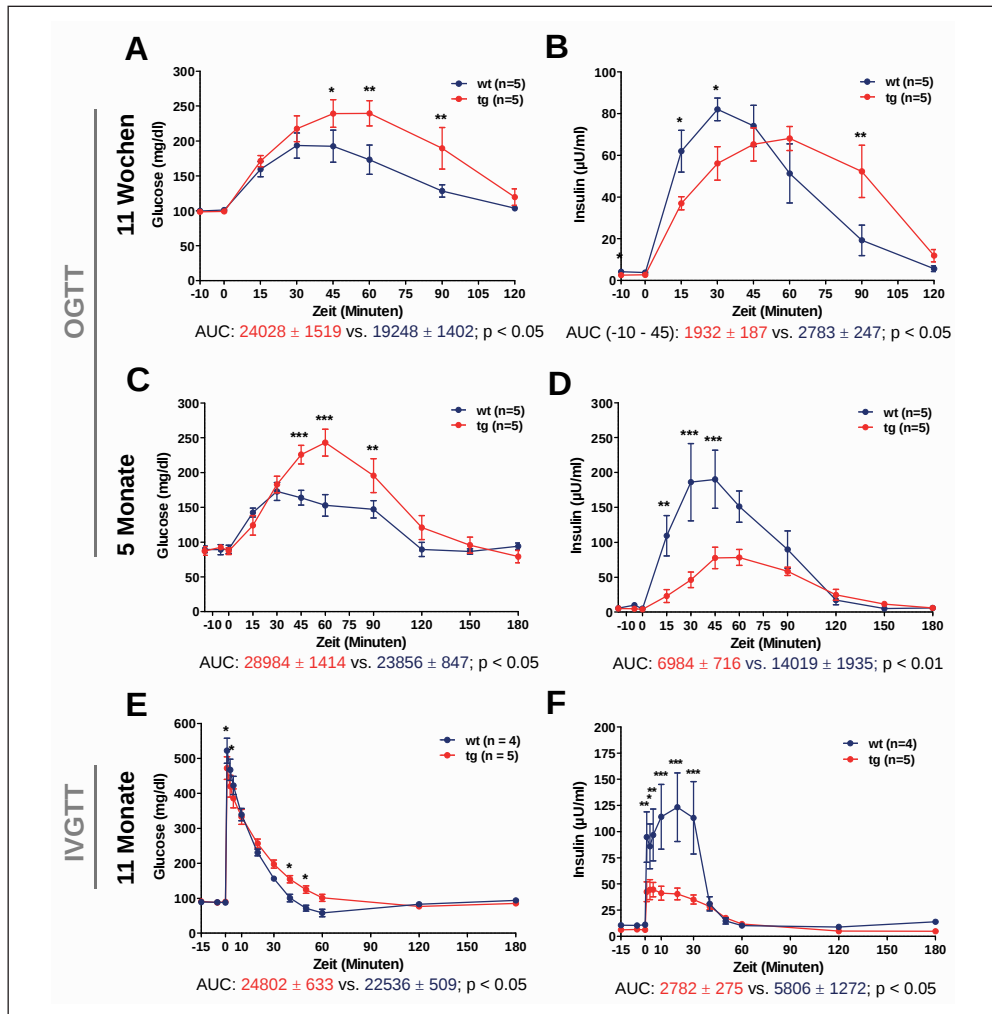


Abb. 3 Verminderte orale Glukosetoleranz bei 11 Wochen und 5 Monate alten GIPR^{dn}-transgenen Schweinen, verminderte intravenöse Glukosetoleranz bei 11 Monate alten GIPR^{dn}-transgenen Schweinen (tg) im Vergleich zu Kontrolltieren (wt). (A, C, E) Serumglukoselevel nach oraler (A, C) und intravenöser (E) Glukosegabe; (B, D, F) Seruminsulinlevel nach oraler (B, D) und intravenöser (F) Glukosegabe; 0 min = Zeitpunkt der Glukosegabe (RENNER et al. 2010).

Ein intravenöser Glukosetoleranztest (IVGTT) wurde bei Tieren im Alter von 11 Wochen, 5 Monaten sowie von 11 Monaten durchgeführt. Bei 11 Wochen alten sowie 5 Monate alten GIPR^{dn}-transgenen Schweinen war die intravenöse Glukosetoleranz wie auch die Insulinsekretion unverändert im Vergleich zu gleich alten, nicht transgenen Kontrolltieren. Allerdings konnte im Alter von 5 Monaten bei den transgenen Tieren eine leichte Tendenz zur verminderten Glukosetoleranz und reduzierten Insulinsekretion festgestellt werden. Bei 11 Monate alten GIPR^{dn}-transgenen Schweinen hingegen war die intravenöse Glukosetoleranz signifikant vermindert, ebenso die Insulinsekretion (Abb. 3E/F) (RENNER et al. 2010). Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, dass die Expression des GIPR^{dn} mit steigendem Alter eine generelle Störung der Insulinsekretion und/oder Veränderungen in der Struktur und Integrität der Langerhansschen Inseln des Pankreas verursachen könnte.

Quantitativ-stereologische Untersuchungen des Pankreas bestätigten diesen Verdacht. Bei GIPR^{dn}-transgenen Schweinen im Alter von 5 Monaten sowie von 1–1,4 Jahren konnte ein signifikant vermindertes Gesamtbetazellvolumen festgestellt werden. Eine 35 %ige Reduktion zeigte sich bei den 5 Monate alten transgenen Tieren, während im Alter von 1–1,4 Jahren eine fast 60 %ige Reduktion des Gesamtbetazellvolumens vorlag. Die Zunahme des Gesamtbetazellvolumens bis zu einem Alter von 5 Monaten war bei GIPR^{dn}-transgenen Schweinen signifikant niedriger im Vergleich zu Kontrolltieren. Zwischen einem Alter von 5 Monaten und 1–1,4 Jahren sistierte die Zunahme bei den transgenen Tieren beinahe komplett, während bei den Kontrolltieren ein 1,5-facher Zuwachs stattfand (Abb. 4A).

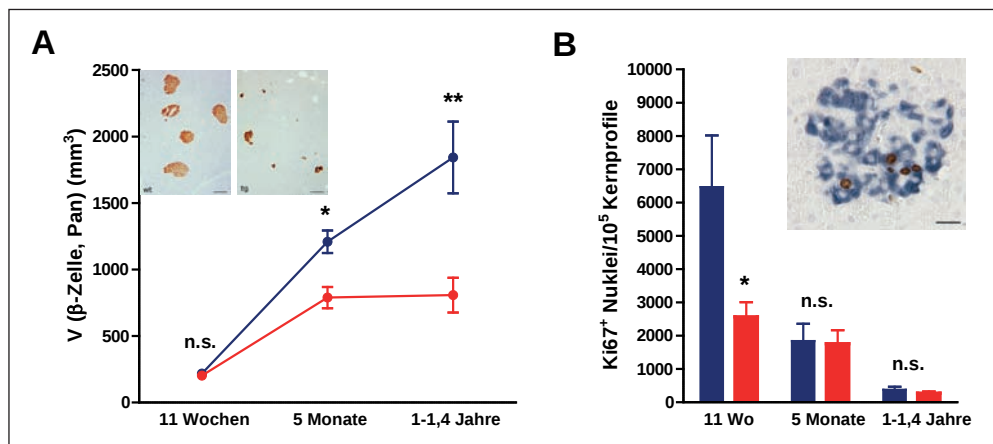


Abb. 4 Reduktion des Gesamtbetazellvolumens sowie der Proliferationsrate von Beta-Zellen bei GIPR^{dn}-transgenen Schweinen. Gesamtbetazellvolumen (A) und Beta-Zellproliferationsrate (B) von 11 Wochen, 5 Monate und 1–1,4 Jahre alten GIPR^{dn}-transgenen Schweinen (rot) im Vergleich zu Kontrolltieren (blau). (A) Immunhistochemische Insulinfärbung eines 1 Jahr alten transgenen Tieres sowie eines Kontrolltieres; Maßstabsbalken 200 µm; (B) Immunhistochemische Doppelfärbung für Insulin (blau) und den Proliferationsmarker Ki67 (braun), Maßstabsbalken 20 µm (RENNER et al. 2010).

Um die Ursache für die Reduktion des Gesamtbetazellvolumens bei älteren GIPR^{dn}-transgenen Tieren zu untersuchen, wurden die Proliferations- sowie die Apoptoseraten von Beta-Zellen bei GIPR^{dn}-transgenen Schweinen und nicht-transgenen Kontrolltieren aller drei Altersstufen (11 Wochen, 5 Monate, 1–1,4 Jahre) mittels quantitativ-stereologischer Untersuchungen be-

stimmt. Dafür wurden doppelimmunhistochemische Färbungen für den Proliferationsmarker Ki67 in Kombination mit einer Insulinfärbung sowie für den Apoptosemarker Caspase-3 in Kombination mit einer Insulinfärbung angefertigt. Im Alter von 11 Wochen zeigten GIPR^{dn}-transgene Tiere eine signifikant reduzierte Proliferationsrate der Beta-Zellen (60%ige Reduktion), wohingegen bei 5 Monate und 1–1,4 Jahre alten Tieren kein Unterschied zwischen beiden Gruppen festzustellen war (Abb. 4B). Im Alter von 1–1,4 Jahren zeigte sich bei den transgenen Tieren eine Tendenz zu einer erhöhten Beta-Zell-Apoptoserate, bei den jüngeren Tieren bestand jedoch kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (RENNER et al. 2010).

Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal in einem Großtiermodell, dass GIP eine essentielle Rolle bei der physiologischen Expansion der Beta-Zellmasse spielt.

Das GIPR^{dn}-transgene Schweinemodell spiegelt zudem wichtige Aspekte des Typ-2-Diabetes mellitus des Menschen wider: eine verminderte insulinotrope Funktion von GIP, eine verminderte Glukosetoleranz und Insulinsekretion sowie eine reduzierte Beta-Zellmasse. Das neue Schweinemodell bietet vielfältige Optionen für die translationale Diabetesforschung. Ein Gebiet ist die weitere Entwicklung und Validierung Inkretin-basierter Therapieansätze, die in der modernen Diabetesbehandlung eine wichtige Rolle spielen. Eine weitere Anwendung ist die Entwicklung bildgebender Verfahren zur Darstellung der Beta-Zellmasse am Patienten. Dafür eignet sich das neue Schweinemodell besonders gut, da es eine verminderte altersabhängige Expansion der Beta-Zellmasse aufweist.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Am GIPR^{dn}-transgenen Schweinemodell konnte gezeigt werden, wie ausgehend von einem pathophysiologischen und/oder genetischen Befund beim Menschen über verschiedene Mausmodelle letztlich ein Großtiermodell entwickelt werden kann, das die Translation von Erkenntnissen aus der Grundlagenforschung in die klinische Anwendung katalysieren kann. Weitere Schweinemodelle, die sich mit anderen Aspekten des humanen Diabetes mellitus befassen, befinden sich in der Entwicklung. Ähnliche Ansätze werden derzeit für die Mukoviszidose, neurodegenerative und kardiovaskuläre Erkrankungen verfolgt. Insgesamt ist der Sektor der „Translationalen Medizin“ ein neues, hochattraktives und zukunftsweisendes Gebiet, dessen Entwicklung durch eine enge Zusammenarbeit von Human- und Tiermedizin katalysiert werden kann.

Literatur

- AHREN, B.: DPP-4 inhibitors. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21/4, 517–533 (2007)
- AHREN, B.: Clinical results of treating type 2 diabetic patients with sitagliptin, vildagliptin or saxagliptin-diabetes control and potential adverse events. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 23/4, 487–498 (2009)
- AHREN, B., SIMONSSON, E., LARSSON, H., LANDIN-OLSSON, M., TORGEIRSSON, H., JANSSON, P. A., SANDQVIST, M., BÄVENHOLM, P., EFENDIC, S., ERIKSSON, J. W., DICKINSON, S., and HOLMES, D.: Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25/5, 869–875 (2002)
- AIGNER, B., RENNER, S., KESSLER, B., KLYMIUK, N., KUROME, M., WÜNSCH, A. and WOLF, E.: Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J. Mol. Med.* 88/7, 653–664 (2010)
- ALMIND, K., AMBYE, L., URHAMMER, S. A., HANSEN, T., ECHWALD, S. M., HOLST, J. J., GROMADA, J., THORENS, B., and PEDERSEN, O.: Discovery of amino acid variants in the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide

- (GIP) receptor: the impact on the pancreatic beta cell responses and functional expression studies in Chinese hamster fibroblast cells. *Diabetologia* 41/10, 1194–1198 (1998)
- American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33, Suppl. 1, 62–69 (2010)
- BAGGIO, L. L., and DRUCKER, D. J.: Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132/6, 2131–2157 (2007)
- BENECH-KIEFFER, F., WEGRICH, P., SCHWARZENBACH, R., KLECAK, G., WEBER, T., LECLAIRE, J., and SCHAEFER, H.: Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13/6, 324–335 (2000)
- BROWN, J. C.: A gastric inhibitory polypeptide. I. The amino acid composition and the tryptic peptides. *Can. J. Biochem.* 49/2, 255–261 (1971)
- BROWN, J. C., and DRYBURGH, J. R.: A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence. *Can. J. Biochem.* 49/8, 867–872 (1971)
- BROWN, J. C., DRYBURGH, J. R., ROSS, S. A., and DUPRÉ, J.: Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide. *Recent Prog. Horm. Res.* 31, 487–532 (1975)
- BROWN, J. C., PEDERSON, R. A., JORPES, E., and MUTT, V.: Preparation of highly active enterogastrone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 47/1, 113–114 (1969)
- BRUBAKER, P. L., and DRUCKER, D. J.: Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology* 145/6, 2653–2659 (2004)
- BUSE, J. B., HENRY, R. R., HAN, J., KIM, D. D., FINEMAN, M. S., BARON, A. D., and *Exenatide-113 Clinical Study Group*: Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27/11, 2628–2635 (2004)
- BUTLER, A. E., JANSON, J., BONNER-WEIR, S., RITZEL, R., RIZZA, R. A., and BUTLER, P. C.: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52/1, 102–110 (2003)
- CHRISTENSEN, M., and KNOP, F. K.: Once-weekly GLP-1 agonists: How do they differ from exenatide and liraglutide? *Curr. Diab. Rep.* 10/2, 124–132 (2010)
- CLARK, A., WELLS, C. A., BULEY, I. D., CRUICKSHANK, J. K., VANHEGAN, R. I., MATTHEWS, D. R., COOPER, G. J., HOLMAN, R. R., and TURNER, R. C.: Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9/4, 151–159 (1988)
- CLASSEN, M., DIEHL, V., und KOCHSIEK, K.: *Innere Medizin*. 5. Aufl. München: Urban & Fischer 2004
- CYPESS, A. M., UNSON, C. G., WU, C. R., and SAKMAR, T. P.: Two cytoplasmic loops of the glucagon receptor are required to elevate cAMP or intracellular calcium. *J. Biol. Chem.* 274/27, 19455–19464 (1999)
- DEACON, C. F., JOHNSEN, A. H., and HOLST, J. J.: Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80/3, 952–957 (1995)
- DEFRONZO, R. A., RATNER, R. E., HAN, J., KIM, D. D., FINEMAN, M. S., and BARON, A. D.: Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28/5, 1092–1100 (2005)
- DING, W. G., and GROMADA, J.: Protein kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta-cells by glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Diabetes* 46/4, 615–621 (1997)
- DOUGLAS, W. R.: Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci.* 3/3, 226–234 (1972)
- DRÖGEMÜLLER, C., BECKER, D., KESSLER, B., KEMTER, E., TETENS, J., JURINA, K., JÄDERLUND, K. H., FLAGSTAD, A., PERLOSKI, M., LINDBLAD-TOH, K., and MATIASKE, K.: A deletion in the N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) gene in Greyhounds with polyneuropathy. *PLoS One* 5/6, e11258 (2010)
- DRÖGEMÜLLER, C., DRÖGEMÜLLER, M., LEEB, T., MASCARELLO, F., TESTONI, S., ROSSI, M., GENTILE, A., DAMIANI, E., and SACCHETTO, R.: Identification of a missense mutation in the bovine ATP2A1 gene in congenital pseudomyotonia of Chianina cattle: an animal model of human Brody disease. *Genomics* 92/6, 474–477 (2008)
- DUPRE, J., ROSS, S. A., WATSON, D., and BROWN, J. C.: Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37/5, 826–828 (1973)
- EDGHILL, E. L., DIX, R. J., FLANAGAN, S. E., BINGLEY, P. J., HATTERSLEY, A. T., ELLARD, S., and GILLESPIE, K. M.: HLA genotyping supports a nonautoimmune etiology in patients diagnosed with diabetes under the age of 6 months. *Diabetes* 55/6, 1895–1898 (2006)
- EDWARDS, C. M., STANLEY, S. A., DAVIS, R., BRYNES, A. E., FROST, G. S., SEAL, L. J., GHATEI, M. A., and BLOOM, S. R.: Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281/1, E155–161 (2001)

- EISSELE, R., GÖKE, R., WILLEMER, S., HARTHUS, H. P., VERMEER, H., ARNOLD, R., and GÖKE, B.: Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur. J. Clin. Invest.* 22/4, 283–291 (1992)
- ELSNER, M., GULDBAKKE, B., TIEDGE, M., MUNDAY, R., and LENZEN, S.: Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43/12, 1528–1533 (2000)
- FARILLA, L., BULOTTA, A., HIRSHBERG, B., LI CALZI, S., KHOURY, N., NOUSHMEHR, H., BERTOLOTTO, C., DI MARIO, U., HARLAN, D. M., and PERFETTI, R.: Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 144/12, 5149–5158 (2003)
- FARILLA, L., HUI, H., BERTOLOTTO, C., KANG, E., BULOTTA, A., DI MARIO, U., and PERFETTI, R.: Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology* 143/11, 4397–4408 (2002)
- GARBER, A., HENRY, R., RATNER, R., GARCIA-HERNANDEZ, P. A., RODRIGUEZ-PATZI, H., OLVERA-ALVAREZ, I., HALE, P. M., ZDRAVKOVIC, M., BODE, B., and LEAD-3 (Mono) Study Group: Liraglutide versus glimepiride monotherapy for type 2 diabetes (LEAD-3 Mono): a randomised, 52-week, phase III, double-blind, parallel-treatment trial. *Lancet* 373/9662, 473–481 (2009)
- GREEN, B. D., and FLATT, P. R.: Incretin hormone mimetics and analogues in diabetes therapeutics. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21/4, 497–516 (2007)
- GREEN, B. D., LAVERY, K. S., IRWIN, N., O'HARTE, F. P., HARRIOTT, P., GREER, B., BAILEY, C. J., and FLATT, P. R.: Novel glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog (Val8)GLP-1 results in significant improvements of glucose tolerance and pancreatic beta-cell function after 3-week daily administration in obese diabetic (ob/ob) mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318/2, 914–921 (2006)
- GREEN, B. D., MOONEY, M. H., GAULT, V. A., IRWIN, N., BAILEY, C. J., HARRIOTT, P., GREER, B., FLATT, P. R., and O'HARTE, F. P.: Lys9 for Glu9 substitution in glucagon-like peptide-1(7-36)amide confers dipeptidylpeptidase IV resistance with cellular and metabolic actions similar to those of established antagonists glucagon-like peptide-1(9-36)amide and exendin (9-39). *Metabolism* 53/2, 252–259 (2004)
- HARMAR, A. J.: Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol.* 2/12, REVIEWS3013 (2001)
- HASLER-RAPACZ, J., ELLEGREN, H., FRIDOLFSSON, A. K., KIRKPATRICK, B., KIRK, S., ANDERSSON, L., and RAPACZ, J.: Identification of a mutation in the low density lipoprotein receptor gene associated with recessive familial hypercholesterolemia in swine. *Amer. J. Med. Genet.* 76/5, 379–386 (1998)
- HEINE, R. J., VAN GAAL, L. F., JOHNS, D., MIHM, M. J., WIDEL, M. H., BRODOWS, R. G., and GWAA Study Group: Exenatide versus insulin glargine in patients with suboptimally controlled type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 143/8, 559–569 (2005)
- HERBACH, N., GOEKE, B., SCHNEIDER, M., HERMANN, W., WOLF, E., and WANKE, R.: Overexpression of a dominant negative GIP receptor in transgenic mice results in disturbed postnatal pancreatic islet and beta-cell development. *Regul. Pept.* 125/1–3, 103–117 (2005)
- HOENIG, M., HALL, G., FERGUSON, D., JORDAN, K., HENSON, M., JOHNSON, K., and O'BRIEN, T.: A feline model of experimentally induced islet amyloidosis. *Amer. J. Pathol.* 157/6, 2143–2150 (2000)
- HUGE, A., WEBER, E., and EHRLEIN, H. J.: Effects of enteral feedback inhibition on motility, luminal flow, and absorption of nutrients in proximal gut of minipigs. *Dig. Dis. Sci.* 40/5, 1024–1034 (1995)
- JAY, T. R., HEALD, K. A., CARLESS, N. J., TOPHAM, D. E., and DOWNING, R.: The distribution of porcine pancreatic beta-cells at ages 5, 12 and 24 weeks. *Xenotransplantation* 6/2, 131–140 (1999)
- KENDALL, D. M., RIDDLE, M. C., ROSENSTOCK, J., ZHUANG, D., KIM, D. D., FINEMAN, M. S., and BARON, A. D.: Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea. *Diabetes Care* 28/5, 1083–1091 (2005)
- KLONOFF, D. C., BUSE, J. B., NIELSEN, L. L., GUAN, X., BOWLUS, C. L., HOLCOMBE, J. H., WINTLE, M. E., and MAGGS, D. G.: Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years. *Curr. Med. Res. Opin.* 24/1, 275–286 (2008)
- KLYMIUK, N., AIGNER, B., BREM, G., and WOLF, E.: Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 77/3, 209–221 (2010)
- KRAFT, W., and DÜRR, U. M.: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 6. Aufl. Stuttgart, New York (USA): Schattauer 2005
- LARSEN, M. O., and ROLIN, B.: Use of the Gottingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research. *ILAR J.* 45/3, 303–313 (2004)
- LARSEN, M. O., ROLIN, B., WILKEN, M., CARR, R. D., and GOTTFREDSEN, C. F.: Measurements of insulin secretory capacity and glucose tolerance to predict pancreatic beta-cell mass in vivo in the nicotinamide/streptozotocin Gottingen minipig, a model of moderate insulin deficiency and diabetes. *Diabetes* 52/1, 118–123 (2003)
- LEAHY, J. L.: Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch. Med. Res.* 36/3, 197–209 (2005)

- LEDoux, S. P., and WILSON, G. L.: Effects of streptozotocin on a clonal isolate of rat insulinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 804/4, 387–392 (1984)
- LENZEN, S.: The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51/2, 216–226 (2008)
- LI, Y., HANSOTIA, T., YUSTA, B., RIS, F., HALBAN, P. A., and DRUCKER, D. J.: Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278/1, 471–478 (2003)
- LINDGREN, M., GALLET, X., SOOMETS, U., HÄLLBRINK, M., BRÅKENHJELM, E., POOGA, M., BRASSEUR, R., LANGEL, U.: Translocation properties of novel cell penetrating transportan and penetratin analogues. *Bioconjug. Chem.* 11/5, 619–626 (2000)
- LUKINIUS, A., KORSGREN, O., GRIMELIUS, L., and WILANDER, E.: Expression of islet amyloid polypeptide in fetal and adult porcine and human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 137/12, 5319–5325 (1996)
- LYNN, F. C., PAMIR, N., NG, E. H., MCINTOSH, C. H., KIEFFER, T. J., and PEDERSON, R. A.: Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetes* 50/5, 1004–1011 (2001)
- LYNN, F. C., THOMPSON, S. A., POSPISILIK, J. A., EHSER, J. A., HINKE, S. A., PAMIR, N., MCINTOSH, C. H., and PEDERSON, R. A.: A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells. *FASEB J.* 17/1, 91–93 (2003)
- MAIDA, A., HANSOTIA, T., LONGUET, C., SEINO, Y., and DRUCKER, D. J.: Differential importance of glucose-dependent insulinotropic polypeptide vs glucagon-like peptide 1 receptor signalling for beta cell survival in mice. *Gastroenterology* 137/6, 2146–2157 (2009)
- MARRE, M., SHAW, J., BRÄNDLE, M., BEBAKAR, W. M., KAMARUDDIN, N. A., STRAND, J., ZDRAVKOVIC, M., LE THI, T. D., COLAGIURI, S., and LEAD-1 SU Study Group: Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, added to a sulphonylurea over 26 weeks produces greater improvements in glycaemic and weight control compared with adding rosiglitazone or placebo in subjects with Type 2 diabetes (LEAD-1 SU). *Diabet. Med.* 26/3, 268–278 (2009)
- MEHNERT, H., STANDL, E., USADEL, K.-H., and HÄRING, K.-U. (Eds.): *Diabetologie in Klinik und Praxis*. 5. Aufl. Stuttgart u. a.: Thieme 2003
- MEYER, W.: Comments on the suitability of swine skin as a biological model for human skin. *Hautarzt* 47/3, 178–182 (1996)
- MILLER, E. R., and ULLREY, D. E.: The pig as a model for human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 7, 361–382 (1987)
- MOJISOV, S., HEINRICH, G., WILSON, I. B., RAVAZZOLA, M., ORCI, L., and HABENER, J. F.: Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J. Biol. Chem.* 261/25, 11880–11889 (1986)
- MONSHOUWER, M., and WITKAMP, R. F.: Cytochromes and cytokines: changes in drug disposition in animals during an acute phase response: a mini-review. *Vet. Q.* 22/1, 17–20 (2000)
- MOODY, A. J., THIM, L., and VALVERDE, I.: The isolation and sequencing of human gastric inhibitory peptide (GIP). *FEBS Lett.* 172/2, 142–148 (1984)
- MURAKAMI, T., HITOMI, S., OHTSUKA, A., TAGUCHI, T., and FUJITA, T.: Pancreatic insulo-acinar portal systems in humans, rats, and some other mammals: scanning electron microscopy of vascular casts. *Microsc. Res. Tech.* 37/5–6, 478–488 (1997)
- NAUCK, M., FRID, A., HERMANSEN, K., SHAH, N. S., TANKOVA, T., MITHA, I. H., ZDRAVKOVIC, M., DÜRING, M., MATTHEWS, D. R., and LEAD-2 Study Group: Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study. *Diabetes Care* 32/1, 84–90 (2009)
- NAUCK, M. A., BARTELS, E., ORSKOV, C., EBERT, R., and CREUTZFELDT, W.: Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76/4, 912–917 (1993a)
- NAUCK, M. A., HEIMESAAT, M. M., ORSKOV, C., HOLST, J. J., EBERT, R., and CREUTZFELDT, W.: Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 91/1, 301–307 (1993b)
- NAUCK, M., STOCKMANN, F., EBERT, R., and CREUTZFELDT, W.: Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29/1, 46–52 (1986)
- O'BRIEN, T. D., BUTLER, P. C., WESTERMARK, P., and JOHNSON, K. H.: Islet amyloid polypeptide: a review of its biology and potential roles in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Vet. Pathol.* 30/4, 317–332 (1993)
- O'BRIEN, T. D., WAGNER, J. D., LITWAK, K. N., CARLSON, C. S., CEFALU, W. T., JORDAN, K., JOHNSON, K. H., and BUTLER, P. C.: Islet amyloid and islet amyloid polypeptide in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): an animal model of human non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Vet. Pathol.* 33/5, 479–485 (1996)

- ORCI, L., STEFAN, Y., MALAISSE-LAGAE, F., and PERRELET, A.: Instability of pancreatic endocrine cell populations throughout life. *Lancet* *1/8116*, 615–616 (1979)
- PARK, S., HONG, S. M., and SUNG, S. R.: Exendin-4 and exercise promotes beta-cell function and mass through IRS2 induction in islets of diabetic rats. *Life Sci.* *82/9–10*, 503–511 (2008)
- POTTER, K. J., ABEDINI, A., MAREK, P., KLIMEK, A. M., BUTTERWORTH, S., DRISCOLL, M., BAKER, R., NILSSON, M. R., WARNOCK, G. L., OBERHOLZER, J., BERTERA, S., TRUCCO, M., KORBUTT, G. S., FRASER, P. E., RALEIGH, D. P., and VERCHERE, C. B.: Islet amyloid deposition limits the viability of human islet grafts but not porcine islet grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107/9*, 4305–4310 (2010)
- QVIST, M. H., HOECK, U., KREILGAARD, B., MADSEN, F., and FROKJAER, S.: Evaluation of Gottingen minipig skin for transdermal in vitro permeation studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* *11/1*, 59–68 (2000)
- RENNER, S., FEHLINGS, C., HERBACH, N., HOFMANN, A., WALDTHAUSEN, D. C. VON, KESSLER, B., ULRICHS, K., CHODNEVSKAJA, I., MOSKALENKO, V., AMSELGRUBER, W., GÖKE, B., PFEIFER, A., WANKE, R., and WOLF, E.: Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* *59/5*, 1228–1238 (2010)
- ROSENTHAL, M., DOBERNE, L., GREENFIELD, M., WIDSTROM, A., and REAVEN, G. M.: Effect of age on glucose tolerance, insulin secretion, and in vivo insulin action. *J. Amer. Geriatr. Soc.* *30/9*, 562–567 (1982)
- SAKURABA, H., MIZUKAMI, H., YAGIHASHI, N., WADA, R., HANYU, C., and YAGIHASHI, S.: Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* *45/1*, 85–96 (2002)
- SALAPATEK, A. M., MACDONALD, P. E., GAISANO, H. Y., and WHEELER, M. B.: Mutations to the third cytoplasmic domain of the glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor can functionally uncouple GLP-1-stimulated insulin secretion in HIT-T15 cells. *Mol. Endocrinol.* *13/8*, 1305–1317 (1999)
- SAXENA, R., HIVERT, M. F., et al.: Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. *Nature Genet.* *42/2*, 142–148 (2010)
- SCHMIDT, W. E., SIEGEL, E. G., and CREUTZFELDT, W.: Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia* *28/9*, 704–707 (1985)
- SHAW, J. E., SICREE, R. A., and ZIMMET, P. Z.: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *87/1*, 4–14 (2010)
- SONNENBERG, G. E., and BERGER, M.: Human insulin: much ado about one amino acid? *Diabetologia* *25/6*, 457–459 (1983)
- STOY, J., EDGHILL, E. L., FLANAGAN, S. E., YE, H., PAZ, V. P., PLUZHNIKOV, A., BELOW, J. E., HAYES, M. G., COX, N. J., LIPKIND, G. M., LIPTON, R. B., GREELEY, S. A., PATCH, A. M., ELLARD, S., STEINER, D. F., HATTERSLEY, A. T., PHILIPSON, L. H., BELL, G. I., and *Neonatal Diabetes International Collaborative Group*: Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104/38*, 15040–15044 (2007)
- TAKEDA, J., SEINO, Y., TANAKA, K., FUKUMOTO, H., KAYANO, T., TAKAHASHI, H., MITANI, T., KURONO, M., SUZUKI, T., and TOBE, T.: Sequence of an intestinal cDNA encoding human gastric inhibitory polypeptide precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *84/20*, 7005–7008 (1987)
- TAO, B., PIETROPAOLO, M., ATKINSON, M., SCHATZ, D., and TAYLOR, D.: Estimating the cost of type 1 diabetes in the U.S.: a propensity score matching method. *PLoS One* *5/7*, e11501 (2010)
- TOFT-NIELSEN, M. B., DAMHOLT, M. B., MADSBAD, S., HILSTED, L. M., HUGHES, T. E., MICHELSEN, B. K., and HOLST, J. J.: Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86/8*, 3717–3723 (2001)
- TRÜMPER, A., TRÜMPER, K., TRUSHEIM, H., ARNOLD, R., GÖKE, B., and HÖRSCH, D.: Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol. Endocrinol.* *15/9*, 1559–1570 (2001)
- TSENG, C. C., BOYLAN, M. O., JARBOE, L. A., USDIN, T. B., and WOLFE, M. M.: Chronic desensitization of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor in diabetic rats. *Amer. J. Physiol.* *270* (4 Pt 1), E661–666 (1996)
- TURNER, R. C., MATTHEWS, D. R., CLARK, A., O'RAHILLY, S., RUDENSKI, A. S., and LEVY, J.: Pathogenesis of NIDDM – a disease of deficient insulin secretion. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* *2/2*, 327–342 (1988)
- VILSBOLL, T., H. AGERSØ, L., LAURITSEN, T., DEACON, C. F., AABOE, K., MADSBAD, S., KRARUP, T., and HOLST, J. J.: The elimination rates of intact GIP as well as its primary metabolite, GIP 3-42, are similar in type 2 diabetic patients and healthy subjects. *Regul. Pept.* *137/3*, 168–172 (2006)
- VILSBOLL, T., KRARUP, T., DEACON, C. F., MADSBAD, S., and HOLST, J. J.: Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* *50/3*, 609–613 (2001)
- VOLLMER, K., HOLST, J. J., BALLER, B., ELLRICHMANN, M., NAUCK, M. A., SCHMIDT, W. E., and MEIER, J. J.: Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* *57/3*, 678–687 (2008)

- WIECZOREK, G., POSPISCHIL, A., and PERENTES, E.: A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). *Exp. Toxicol. Pathol.* 50/3, 151–172 (1998)
- WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R., and KING, H.: Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27/5, 1047–1053 (2004)

Dr. Simone RENNER
Christina BRAUN
Elisabeth STRECKEL
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht
und Biotechnologie
Hackerstraße 27
85764 Oberschleißheim
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 89 218078448
Fax: +49 89 21809978448
E-Mail: S.Renner@gen.vetmed.uni-muenchen.de
C.Braun@gen.vetmed.uni-muenchen.de
E.Streckel@gen.vetmed.uni-muenchen.de

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

IV. Wirtschaftliche Risiken und Chancen der Genom- und Genanalytik

Mögliche Auswirkungen der Etablierung einer genom-basierten Zuchttierbewertung in der Milchrinderzüchtung auf Ebene des Einzelbetriebes

Wilfried BRADE (Hannover)

Mit 7 Abbildungen und 4 Tabellen

Zusammenfassung

Mittels molekulargenetischer Methoden lassen sich Punktmutationen im Genom eines Tieres sicher und umfassend erfassen. Diese als SNPs bezeichneten Stellen sind über das gesamte Genom verteilt und erlauben eine hohe Informationsdichte. SNPs in kodierenden Regionen (= Bereiche, in denen z. B. die wichtigen Proteine genetisch determiniert sind) begründen nutzbare genetische Variabilität. Ihr Nachweis erlaubt eine Leistungsvorhersage wichtiger Merkmale (z. B. Milchleistung, Milchkaseingehalt) bereits an Kälbern (= DNA-Analyse).

Die konsequente Etablierung einer genom-basierten Selektion von männlichen Zuchtkälbern lässt folgendes erwarten: (1.) der Anteil ausschließlich genomgetesteter Jungbullen wird – im Vergleich zur Nutzung töchtergetesteter (Alt-) Bullen – schnell zunehmen; (2.) der Verwandtschaftsgrad zwischen den Jungbullen wird sich weiter erhöhen, da *Pedigree*-Informationen in der Auswahl zusätzlich einfließen; (3.) fördert den möglichen Einstieg privater Unternehmen/Personen in das Besamungsgeschäft (siehe „Reitpferdezucht“); (4.) jeder kann getestete Bullen ab 2013 anbieten; (5.) kann den „Genossenschaftsgedanken“ bäuerlicher Besamungsstationen mindern. Die Genotypisierung von weiblichen Kälbern auf Einzelbetriebsebene kann: (1.) die einzelbetriebliche Spezialisierung weiter fördern; (2.) zur Minderung des Risikos in der Kälber-/Färsenaufzucht genutzt werden.

Abstract

By means of molecular genetic methods point mutations can be proved in the genome of an animal. These places described as a SNPs are distributed over the complete genome and permit a high information density. SNPs in encoding regions (= areas in which e.g. the important proteins are encoded genetically) are causing genetic variability. A proof permits a performance prediction of important traits (e.g. milk yield, milk casein content) of young animals by a molecular genetic analysis of the genotypes.

The consistent establishment of the genomic evaluations of young male calves lets expect the following: (1.) the share of young genomic tested bulls will increase in comparison with the use of daughter tested (old) bulls; (2.) the degree of relationship between the young bulls will increase further; since pedigree-information used in addition in the genomic evaluation; (3.) a private enterprise/person promotes the possible way to enter to the AI-business; (4.) everybody can tested bulls after 2013 in the USA (see “riding horse breeding”); (5.) the ‘co-operative society thought in farmer AI-enterprises can decrease. The genomic evaluations from female calves on farm level can: (1.) promoting the specialization further; (2.) used for the reduction of the risk in the rearing of animals.

1. Einleitung

Die Milcherzeuger unterliegen aktuell einem enormen Preis- und Kostendruck. Generell sollte ein Zuchtprogramm die Rentabilität des Erzeugerbetriebes positiv beeinflussen, die Gesundheit der Tiere nicht gefährden und nicht im Widerspruch zum Tierschutz stehen. Als Unternehmer hat der Rinderhalter folgende Ziele:

- möglichst hohe Gewinne;
- Sicherung eines angemessenen Lebensstandards;
- kalkulierbares Risiko seiner Produktion;
- soziale Arbeitsbelastung und Erfolg als Motivation;
- gesellschaftliche Anerkennung seiner Leistungen.

Wie weit die Milchkuhhalter aktuell von diesen Zielen entfernt sind, belegen die niedrigen Milchpreise bzw. die monetäre Wertschätzung von Milchprodukten; speziell in Deutschland.

Milcherzeuger unterscheiden sich nicht von anderen landwirtschaftlichen Produzenten. Sie können gleichfalls die Preise kaum beeinflussen und müssen daher stets die Produktivität erhöhen und die Stückkosten senken. Nur so kann bei tendenziell weiter steigenden Kosten die notwendige Wettbewerbsfähigkeit gesichert werden. Die Einflussmöglichkeiten des Züchters auf den wirtschaftlichen Erfolg können wie folgt zusammengefasst werden:

- gezielte Leistungssteigerung je Tier/Zeiteinheit (Selektion, Kreuzung);
- Verbesserung der Milchqualität; speziell des MilCHFett/Milcheiweiß-Verhältnisses (= Erhöhung des Milcheiweißgehaltes zuungunsten des MilCHFettgehaltes);
- Verlängerung der Nutzungsdauer der Kühe;
- Reduzierung möglicher Abgangsursachen aufgrund von Erkrankungen/Verletzungen;
- eine kurze Färsenaufzuchtdauer.

Die Frage, die sich auf Ebene des Einzelbetriebes stellt, lautet: Kann die gezielte Integration genombasierter Selektionsverfahren bei der Vartierauswahl und/oder bei der frühzeitigen Auswahl von Kälbern zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit bzw. zur Minderung des Risikos der Produktion beitragen?

2. Ist-Stand der Holstein-Züchtung in Deutschland

In Deutschland werden aktuell mit ca. 4,1 Mio. Kühen jährlich etwa 28 Mio. t Milch in zurzeit (noch) 102 000 landwirtschaftlichen Betrieben bei einem mittleren Fettgehalt von 4,0 bis 4,2 % und einem mittleren Eiweißgehalt von 3,35 bis 3,4 % erzeugt.

Während in der Vergangenheit die erzeugte Milch vorrangig für Frischmilchprodukte und Butter (= MilCHFett) verwendet wurde, wird zwischenzeitlich die Käseerzeugung, d. h. die Verwendung des Milcheiweißes, immer wichtiger. Als Hauptgründe für den permanent wachsenden Käsemarkt können der langfristige Trend in Richtung einer fettärmeren Ernährung, die zunehmende Angebotsvielfalt und die verbesserte Präsentation von Käse im Einzelhandel ausgemacht werden.

In der Deutschen Holstein-Zucht (DH) lässt sich ein jährlicher Zuchtfortschritt für die Milchmenge (bereits in der 1. Laktation) in Höhe von ca. 80–120 kg Milch/Kuh/Laktation nachweisen (BRADÉ und DISTL 2009a, b). Enorme Zuchtfortschritte wurden auch bei der Herauszüchtung eines funktionellen Exterieurs erzielt. Weniger erfolgreich war man allerdings – aufgrund der regelmäßigen Bevorzugung leicht melkender Töchter – bei der Stabilisierung der Zitzenlänge. Auch ist die Sicherung eines hohen Milcheiweißgehaltes ($\geq 3,5\%$) bei der Deutschen Holstein-Zucht bisher nicht gut gelungen.

3. Künftige Herausforderungen an die Milchrinderzüchtung

Die Landwirtschaft steht vor größten Herausforderungen. Bis 2050 wird der Milchverbrauch – weltweit betrachtet – auf etwa 180 % ansteigen. Wesentliche Ursachen dafür sind die schnell weiter wachsende Erdbevölkerung sowie der Kaufkraftzuwachs in vielen Schwellenländern. Der steigende Flächenbedarf für die Erzeugung von Lebensmitteln, Futter bzw. Bioenergie lässt Auswirkungen auf die nur begrenzte Verfügbarkeit von Kraftfutter für die Milcherzeugung erwarten. Angesichts dieser Situation erhält der Futtermittelverbrauch – konkret der Kraftfuttermittelbedarf je Kilogramm Milch – künftig wieder eine höhere ökonomische Bedeutung.

Futter- bzw. nährstoffökonomische Aspekte sowie der Klimaschutz lassen folgendes Zuchtziel zunehmend interessanter werden (vgl. BRADE 2008, BRADE und BRADE 2009): *Sicherstellung hoher Milchmengenleistungen je Kuh/Laktation bei weiterer Verbesserung des Milchfett-/Milchweißverhältnisses (FEV) unter gleichzeitiger Beachtung des Kraftfuttereinsatzes bei langer Nutzungsdauer der Kühe.*

Damit schießt sich dieser Vortrag nahtlos an die Ausführungen von MEYER in diesem Band an.

Zur Erfassung zugehöriger Effekte wurden Laktationsleistungen zwischen 5000 kg und 11000 kg Milch/Kuh/Laktation – bei unterschiedlichen Körpermassen der Kühe (leichtere Kühe bei geringerer Milchmengenleistung) und differenzierten Milchinhaltsstoffen – bewertet (Abb. 1). Gleichzeitig kann gezeigt werden, dass ein höherer Milchweißgehalt in der Milch mit Vorteilen in der Glukosebeschaffung der Kuh verbunden ist (Abb. 2).

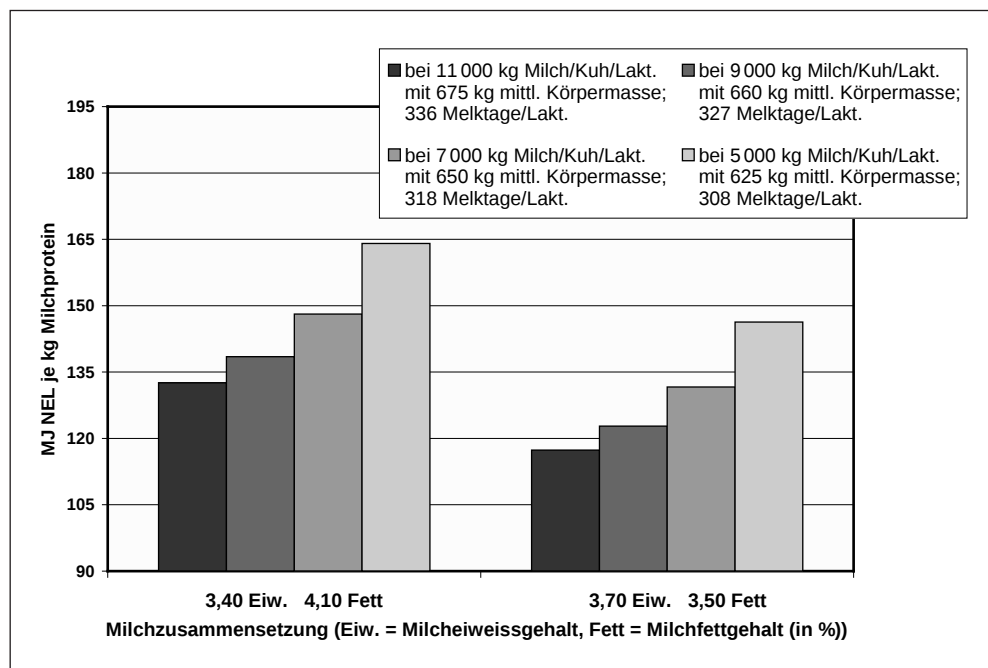


Abb. 1 Futterenergiebedarf in MJ NEL je kg Milchprotein (Basis: Laktation)

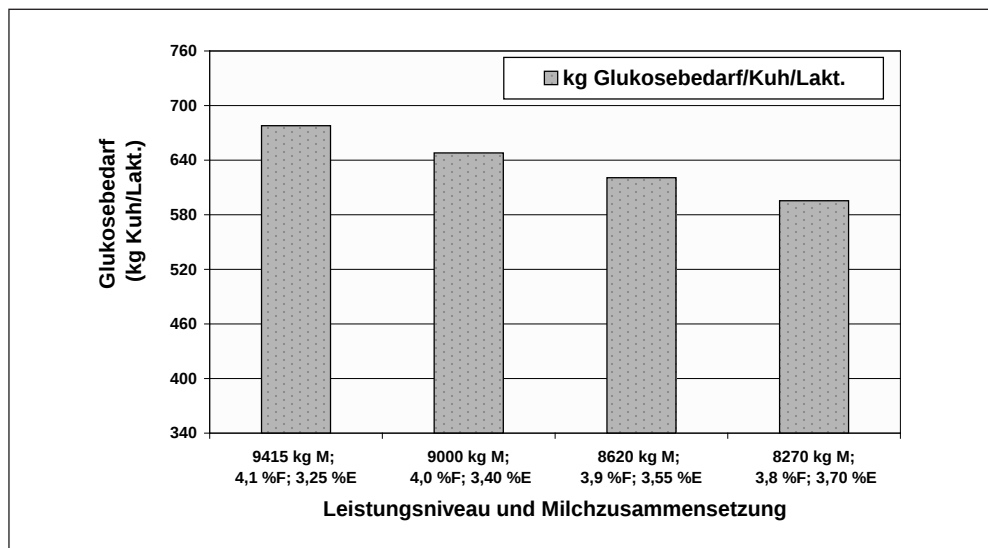


Abb. 2 Bedarf an Glukose (in kg je Kuh/Laktation); konstant: 306 kg Milcheiweiß je Kuh und Laktation (mittlere Körpermasse: 660 kg/Kuh)

Sehr hohe Milchmengenleistungen sind somit nicht notwendigerweise energetisch günstiger als (etwas) niedrigere Milchleistungen mit deutlich höherem Milcheiweißgehalt (Abb. 3).

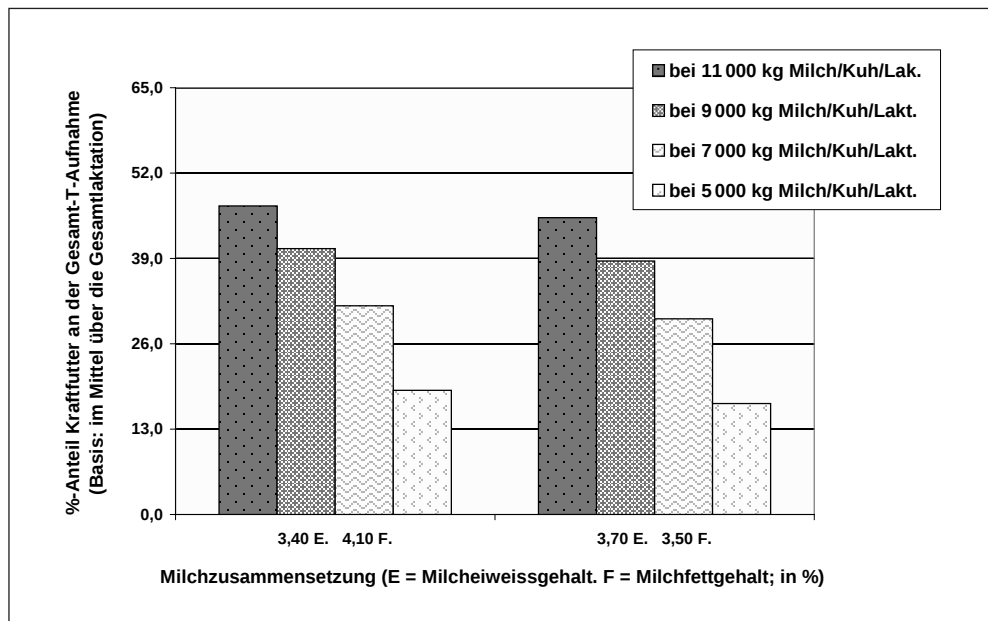


Abb. 3 %-Anteil Kraftfutter an der Gesamt-Trockenmasse-Aufnahme (Mittel über die Gesamtlaktation)

Die genetisch-züchterische Erhöhung des Milcheiweißgehaltes, bei gleichzeitiger Absenkung des MilCHFettgehaltes, führt zu einem reduzierten Energieaufwand (vor allem für die MilCHFetterzeugung) bei einem tendenziell erhöhten Futterproteinbedarf des Einzeltieres. Die generell höhere Futterproteinversorgung, bei höheren Eiweißgehaltswerten in der Milch, sollte jedoch – bei bevorzugter Haltung der Milchkühe in den klassischen Grünlandregionen (wichtigste Grundfutterquelle: Gräser, Klee) und einer standortangepassten Milchleistung (≤ 9500 kg Milch/Kuh/Laktation) – nicht sonderlich problematisch sein. Da das Futteraufnahmevermögen der Kuh begrenzt ist, erfordern speziell sehr hohe Milchmengenleistungen auch sehr hohe Kraftfutteranteile in der Gesamtration (Abb. 3). Setzt man voraus, dass (beispielsweise) einer Kuh täglich 11,5 kg Trockenmasse (T) in Form von Grundfutter (mittlerer Energiegehalt 6,1 MJ NEL /kg T) verabreicht wird, kann der zu deckende Energiebedarf aus dem zusätzlich zu verabreichenden Kraftfutter (KF) abgeleitet werden. Die Ergebnisse sind eindeutig: Milchmengenleistungen von 11 000 kg Milch/Kuh/Laktation (bei einer Laktationslänge von 336 Tagen) erfordern im Mittel einen Kraftfutteranteil von $\geq 45\%$ an der Gesamtration; gemessen als Anteil der Kraftfutter-Trockenmasse-Aufnahme an der Gesamt-Trockenmasse-Aufnahme. Bei 7000 kg Milch/Kuh/Laktation reduziert sich der Kraftfutteranteil in der Ration (im Mittel) auf ca. 29 bis 32%; wiederum in zusätzlicher Abhängigkeit auch von der MilChzusammensetzung.

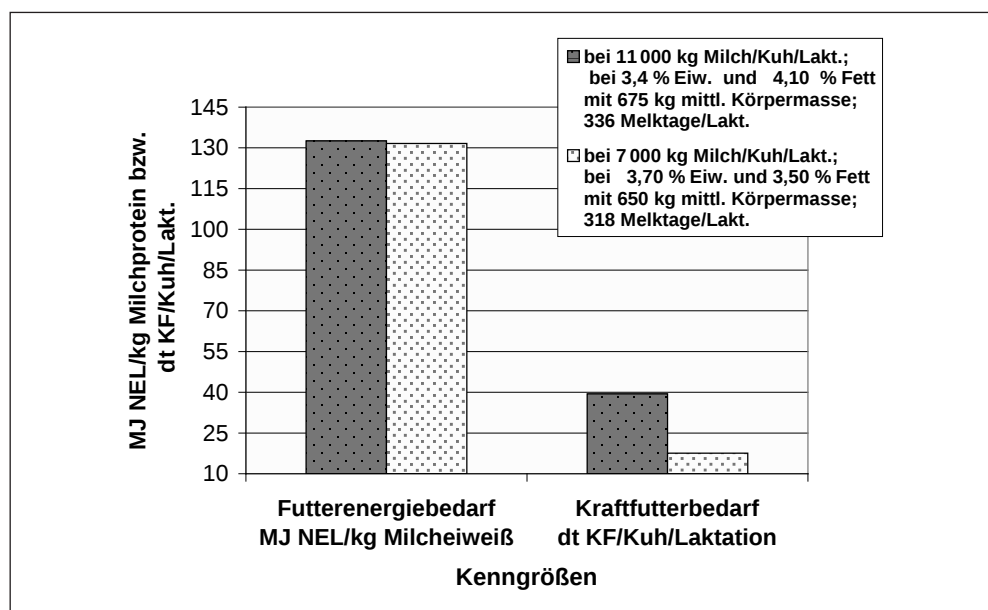


Abb. 4 Nährstoffökonomische Kennwerte bei differenziertem Leistungsniveau und unterschiedlicher MilChzusammensetzung

Es zeigt sich klar: Sehr hohe Milchmengenleistungen (≥ 11000 kg Milch/Kuh/Laktation) mit einem relativ ungünstigen MilCHFett-/Milcheiweiß-Verhältnis sind *nicht* in jedem Fall energetisch bzw. nährstoffökonomisch besser als modifizierte Zuchtzielansätze mit geringerer Milchmengenleistung, aber intensiv verbessertem MilCHFett-/Milcheiweiß-Verhältnis. Die gezielte Veränderung des Verhältnisses der (prozentualen) Gehalte an MilCHFett und MilCh-

eiweiß in der Milch ist – aus genetisch-züchterischer Sicht – jedoch keineswegs trivial. So führt die direkte Selektion auf das Fett/Eiweiß-Verhältnis (FEV) – wie bereits an anderer Stelle sehr ausführlich aufgezeigt – nachweislich nicht zu einer deutlichen Anhebung des Milcheiweißgehaltes und somit nicht zum Erfolg. Nur die gleichzeitige Einbeziehung der verschiedenen Milchleistungsmerkmale – bei direkter, hoher Bewertung des Milcheiweißgehaltes – lässt einen diesbezüglichen Erfolg erwarten (BRADE und BRADE 2009). Selektiert man gezielt auf hohen Milcheiweißgehalt – künftig unter Einbeziehung genombasierter Informationen – und verpaart die besten Vater- und Muttertiere untereinander über mehrere Generationen, so sollte sich eine spezielle Holstein-Linie mit hohem Milcheiweißgehalt und verbessertem Fett/Eiweiß-Verhältnis herauszüchten lassen (Abb. 5).

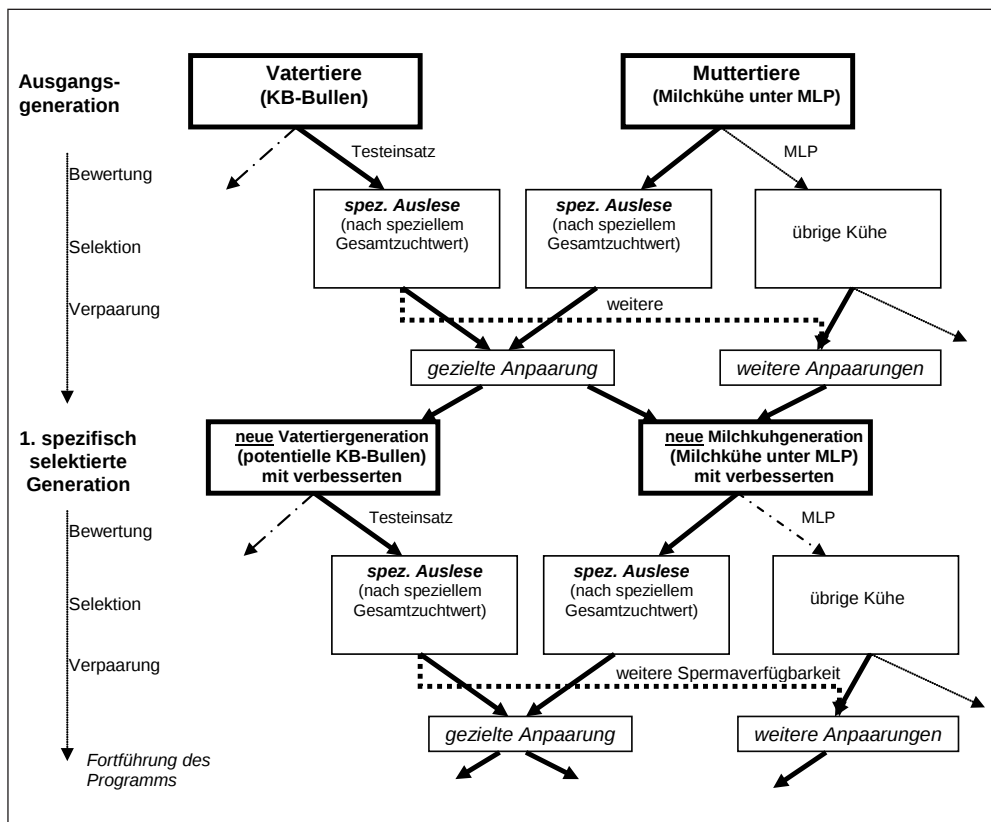


Abb. 5 Gezielte Erzeugung einer spezialisierten Holstein-Linie mit hohem Milcheiweißgehalt und verbessertem Milchfett/Milcheiweiß-Verhältnis (= FEV), einschließlich Beachtung der Funktionalität; ohne Zuchtschließung (BRADE 2008)

Anzumerken bleibt an dieser Stelle, dass allerdings die Milchleistung bzw. der Milcheiweißgehalt und damit das Fett/Eiweiß-Verhältnis nur ein (Haupt-) Selektionskriterium in der Rinderzucht ist. Große Erwartungen werden somit auch hier an eine genomasierte Bewertung von jungen Selektionskandidaten gestellt, die gleichzeitig eine Erfassung der unterschiedlichen Milchproteinfraktionen ermöglicht.

4. Etablierung einer genomasierten Bewertung von Zuchttieren in der Praxis

Die genomische Selektion ist ein neues Zuchtverfahren, das aktuell in die Zuchtpraxis überführt wird. Ziel ist es, bereits sehr früh sichere Zuchtwerte potentieller Zuchttiere zu erhalten. Der Ansatz ist relativ einfach: Der Zuchtwert eines Tieres soll direkt aus seinen Erbanlagen abgeleitet werden. Voraussetzung ist das Vorhandensein ausreichend vieler Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*; sprich: Snips), die über das gesamte Genom (= Erbgut) verteilt sein müssen (DISTL et al. 2009).

Der genomische Zuchtwert eines Tieres ist dann die Summe der Effekte an den einzelnen SNP-Markern. Bereits jetzt werden nur noch DNA-getestete, intensiv vorselektierte Bullen in Besamungsstationen eingestellt (Abb. 6).

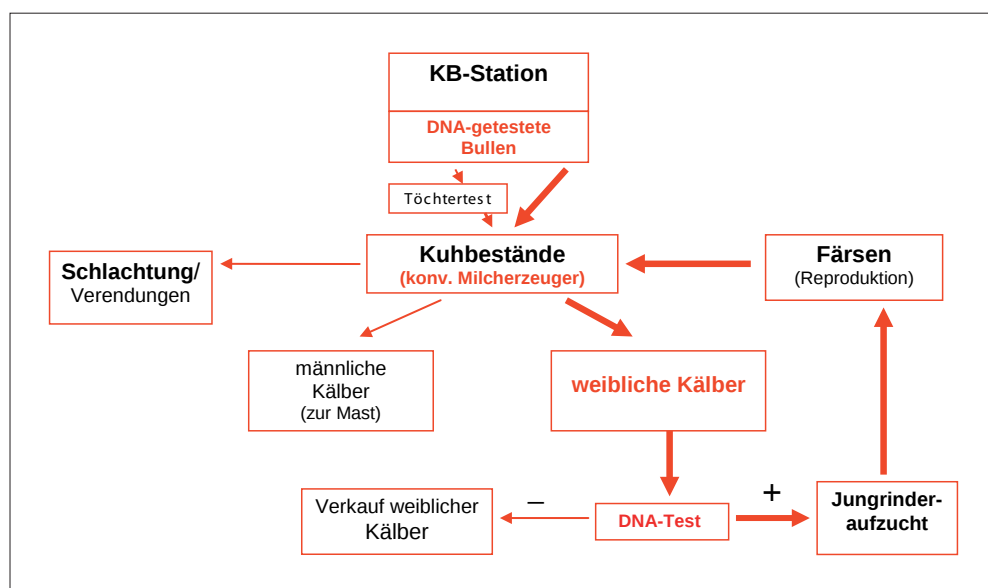


Abb. 6 Mögliche künftige Gestaltung der Züchtung/Selektion auf Betriebsebene

Als Einzelbetrieb partizipiert der konventionelle Milchproduzent auf zwei Ebenen von neuen Entwicklungen im genetisch-züchterischen Bereich:

- bei der Auswahl der Kuhväter (Erb-/Selektionspfad: Bulle – Kuh);
- bei der Auswahl der Kuhmütter (Erb-/Selektionspfad: Kuh – Kuh).

4.1 Auswertungsmethodik

Der zu erwartende Selektionserfolg (pro Zeiteinheit) in der nachfolgenden Generation kann – bei getrennter Auswertung der Vater- und Muttertiere – wie folgt dargestellt werden (vgl. BRADE 1992):

$$\underline{\Delta G} = \frac{\Delta G_{\delta} + \Delta G_{\varphi}}{T_{\delta} + T_{\varphi}} = \frac{\Delta G_{\delta} + \Delta G_{\varphi}}{2 \cdot \bar{T}} = \frac{\Delta G_{\delta}}{2 \cdot \bar{T}} + \frac{\Delta G_{\varphi}}{2 \cdot \bar{T}} \quad [1]$$

mit

ΔG = Zuchtfortschritt in der Nachkommengeneration,

ΔG_{δ} = genetisch bedingte Überlegenheit der Väter,

T_{δ} = Generationsintervall für die Väter (analog die übrigen Symbole),

$\bar{T}$ = mittleres Generationsintervall aus beiden Geschlechtern.

4.2 Bestimmung des zu erwartenden Zuchtfortschrittes

Der Selektionserfolg in der Nachkommengeneration für den Gesamtzuchtwert H aufgrund einer einstufigen Auslese der Väter (oder Mütter) nach dem Selektionskriterium (hier: genetisch begründeter Selektionsindex) I_1 kann wie folgt bestimmt werden (vgl. COCHRAN 1951, NIEBEL und FEWSON 1976):

$$\Delta G_H = \frac{r_{HI_1} \cdot z_1 \cdot J_{11}}{2 \cdot \bar{T} \cdot b_1} \cdot \sigma_H \quad [2]$$

Der Selektionserfolg in der Nachkommengeneration für den Gesamtzuchtwert H aufgrund einer zweistufigen Auslese der Väter (oder Mütter) nach den Selektionskriterien I_1 bzw. I_2 folgt der Beziehung:

$$\Delta G_H = \frac{r_{HI_1} \cdot z_1 \cdot J_{21} + r_{HI_2} \cdot z_2 \cdot J_{22}}{2 \cdot \bar{T} \cdot b_1 \cdot b_2} \cdot \sigma_H \quad [3]$$

wenn jetzt

r_{HI_1} = Korrelation zwischen definiertem Gesamtzuchtwert H und dem Selektionskriterium der i -ten Stufe (I_i),

z_1, z_2 = Ordinatenwerte der Normalverteilung in den standardisierten Selektionspunkten (k_i),

b_1, b_2 = Anteil zur Weiterzucht verwendeter Tiere in der 1. bzw. 2. Stufe,

j_{22} = zugehörige Korrekturwerte,

$\bar{T}$ = mittleres Generationsintervall,

σ_H = Standardabweichung des definierten Gesamtzuchtwertes H bedeuten.

4.3 Aspekte der künftigen Nutzung genomisch vorselektierter Bullen

Beim gegenwärtigen Stand des Wissens zur genombasierten Auslese von Zuchttieren sind die ausschließlich DNA-getesteten Vatertiere generell weniger zuverlässig zuchtwertgeschätzt als vergleichsweise umfassend töchtergetestete Bullen. Mit anderen Worten: Der zu erwartende Zuchtfortschritt bei paralleler Anpaarung beider Bullengruppen (= ausschließlich DNA-getestete Bullen *oder* zusätzlich töchtergetestete Bullen) in der Nachkommengeneration ist von der Sicherheit der Bullenbewertung abhängig. Je höher die Sicherheit der ausschließlich genomisch getesteten Bullen (r^2_{gZW}) im Vergleich zu den töchtergetesteten Bullen ist, umso wettbewerbsfähiger werden die DNA-getesteten Vatertiere.

Auch bei Auswertung des möglichen Zuchtfortschrittes pro Jahr zeigt sich, dass eine sehr intensive Nutzung DNA-getesteter Bullen nur dann berechtigt ist, wenn diese zuverlässig genomisch bewertet und vorselektiert werden können ($r^2_{gZW} \geq 0,60$). Vorausgesetzt wird weiter, eine sehr intensive *zusätzliche* Selektion der Vatertiere nach den Prüfergebnissen der Töchter (= Zwei-Stufen-Selektion) und deren Einsatz aufgrund eingelagerter Spermaportionen aus der Blickrichtung der Verbesserung funktioneller Merkmale (maternales Abkalbeverhalten, Fruchtbarkeit, Nutzungsdauer, Eutergesundheit).

Aktuelle Empfehlungen zur Alternative: Einsatz ausschließlich genomgetesteter Vatertiere *oder* Einsatz töchtergeprüfter Vatertiere sollten die (theoretisch) abgeleiteten Sicherheiten für die DNA-getesteten Jungbullen (r^2_{gZW}) berücksichtigen. Hier zeigt sich zurzeit noch folgendes Bild (nach Angaben Vit Verden 2010):

- hinreichend hohe Sicherheiten ($r^2_{gZW} \geq 0,65$): z. B. für die Milchleistung;
- „grenzwertige“ Sicherheiten ($r^2_{gZW} \sim 0,50$): z. B. für die Nutzungsdauer, Zellzahl;
- noch ungenügende Sicherheiten ($r^2_{gZW} \leq 0,45$): Fruchtbarkeit, maternales Kalbeverhalten.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsache sind folgende Empfehlungen *aktuell* begründet: Züchter/Halter, die vor allem die Funktionalität ihrer Kühe sicher verbessern wollen, sollten weiter auf kostengünstige töchtergeprüfte Bullen mit hohem Vererbungspotenzial in der Funktionalität/Fitness (RZFit ≥ 128) setzen.

Risikobereite, vorrangig an der weiteren Verbesserung der Milchleistung interessierte Züchter/Halter können auch die „nur“ genomgetesteten (Jung-) Bullen intensiv nutzen. Zur Streuung des Risikos sollten hier jedoch möglichst viele verschiedene, genomisch hoch bewertete Vatertiere gleichzeitig – mit jeweils begrenztem Umfang – einzelbetrieblich eingesetzt werden. Neben der Sicherheit der Zuchtwerte bleiben die tierindividuellen Zuchtwertvorhersagen sowie der Spermapreis zu beachten. Der Spermakunde wünscht generell beste Bullen zu günstigsten Preisen einschließlich hoher Serviceleistungen. Da sich die Preisgestaltung auch künftig an der Rangierung der Bullen nach einem Gesamtselektionsindex orientieren wird, dürfte es jedoch keine klaren Preisunterschiede zwischen beiden Bullengruppen geben. Die konsequente zusätzliche Auswahl der Bullenkälber nach ihren genomischen Zuchtwerten qualifiziert die bisherige erste Stufe der KB-Bullenauswahl (= Ankauf der Jungbullen) weiter.

Dies berechtigt, den Umfang des bisherigen Jungbulleneinsatzes (= vorselektiert vor allem nach Pedigree-Informationen) von ca. 20–25 % aller Besamungen auf über 40 % genomgetesteter junger Vatertiere (bei Beibehaltung niedriger Spermapreise) auszudehnen. Bei (künftig) intensiver Nutzung der besten, genomisch vorselektierten Jungbullen (ca. 3000 bis 7000 Besamungen/Jungbulle in Abhängigkeit von der zugehörigen Zuchtwertvorhersage) sind spätere Prüfergebnisse von ≥ 500 Töchtern/Jungbulle zu erwarten. Voraussetzung bleibt eine hohe Kontrolldichte in der Milchleistungsprüfung (MLP). Das bedeutet gleichzeitig: Die künftigen Töchterprüfungen der besten, intensiv genutzten genomisch vorselektierten Jungbullen werden künftig noch sicherer als bisher. Lagert man von jedem Jungbullen zusätzlich ca. 10000–15000 (tiefgefrorene) Spermaportionen ein, ermöglicht diese Vorgehensweise – auch bei Frühschlachtung der KB-Bullen bereits im Alter von ca. 2,5–3 Jahren – das spätere Anbieten äußerst zuverlässig töchtergeprüfter Bullen mit hohen Fitnesswerten (Tab. 1).

Tab. 1 Einfluss einer intensiven Nutzung genomgetesteter Bullen auf die Größe des Zuchtprogramms

Bullengruppe/Nutzungsumfang	Anzahl möglicher Besamungen
80 – 100 DNA-getestete Bullen; ~5000 Spermadosen/Bulle	400 000 – 500 000
20 – 30 töchtergetestete Bullen; ~15000 Spermadosen/Bulle	300 000 – 450 000
<u>mögliche Anpaarungen mit Fleischrinderbullen (Kreuzungen)</u>	<u>100 000 – 50 000</u>
insgesamt (mögliche Besamungen)	800 000 – 1 000 000
Größe des zu betreuenden Jungrinder-/Kuhbestandes (2 Besamungen je Trächtigkeit)	400 000 – 500 000

Quelle: E. BRADE 2010

Kleinere Zuchtprogramme haben (künftig) nur noch begrenzte Möglichkeiten, intensiv ausgelesene, töchtergeprüfte Fitnessvererber zu nutzen. Sie dürften sich auf die intensive Vermarktung der ausschließlich DNA-getesteten Jungbullen konzentrieren.

4.4 Genombasierte Bewertungen im weiblichen Geschlecht

Auch auf der weiblichen Seite kann die gezielte Integration einer genombasierten Vorauswahl der zur Kuhbestandsreproduktion benötigten Tiere zur Kostenentlastung bzw. Risikominimierung der Kälber- und Färsenaufzucht genutzt werden. Betriebswirtschaftliche Vorteile sind hier vor allem in solchen Herden gegeben, deren jährliche Remotierungsquote deutlich unter 30 % liegt (Tab. 2 und 3).

Tab. 2 Einfluss der Nutzungsdauer auf Vorzüglichkeit der Genotypisierung von weiblichen Kälbern (Basis: 1000 Kühe)

Kenngröße	Nutzungsdauer (ND)				
ND (in Jahren)	5,0	4,0	3,0	2,5	2,22
Ergänzungsprozentsatz; E (%)	20	25	33	40	45
jährlich benötigte Erstkalbinnen (1000 Kühe)	200	250	330	400	450
Zahl benötigter ♀-Kälber/Jahr	211	264	348	421	474
jährlich anfallende ♀-Kälber	450 ^[1]	450	450	450	450
Zahl nicht benötigter ♀-Kälber/Jungrinder	239 ^[1]	186	102	29	–24
%-Anteil nicht benötigter ♀-Tiere	53,1	41,3	22,6	6,4	–5,3

[1] ,optimistische“ Kalkulation

Man kann zeigen, dass einzelbetriebliche Vorteile einer frühzeitigen Genotypisierung – trotz hoher Genotypisierungskosten (200 €/Tier) – beispielsweise bei einer Bestandsaufstockung auf Basis der Umwandlung bestehender Jungrinderaufzuchtplätze im Kuhstall (bei möglichem Verzicht der Aufzucht aller anfallenden weiblichen Tiere [= weitere Spezialisierung] bereits aktuell gegeben sind (vgl. Tab. 4 unter Berücksichtigung eines monetären Verlustes von 350 €/aufgezogenes Jungrind).

Tab. 3 Vollkosten in der Niedersächsischen Färsenaufzucht (Anmerkung: 28 Monate EKA)

Futterkosten	900 €	56 %
davon Leistungsfutter	240 €	
davon Grundfutter	660 €	
Gesunderhaltungskosten (TA, Medik.)	55 €	3 %
Besamungskosten	40 €	2 %
Sonst. Direktkosten (Wasser, Zins)	95 €	6 %
Direktkosten gesamt	1090 €	68 %
Arbeitserledigungskosten (Lohn- und Lohnansatz)	360 €	22 %
Gebäudekosten (Unterhaltung, AfA)	105 €	7 %
Sonst. Kosten (Gebühren, Beiträge uvm.)	45 €	3 %
Vollkosten	1600 € ^[1]	100 %

[1] aktuelle Verkaufserlöse: ca. 1250 €/Tier

Eine intensivere Nutzung der genom-basierten Selektion auf der weiblichen Seite (Kuh – Kälber) sollte aber erst dann erwartet werden, wenn eine deutliche Reduzierung der Genotypisierungskosten (< 60 €/Tier) am Markt gegeben ist. Kurz:

- Die konventionellen Milchproduzenten sind an billigen Genotypisierungen interessiert, die sich gleichzeitig auf nur wenige wichtige Merkmale beschränken („customer-oriented“ DNA-chips).
- Die negativ bewerteten weiblichen Tiere erschweren den Tierverkauf; der Landwirt wird möglichst nur die positiven Tiere genotypisieren lassen wollen (vgl. z. B. Hundezucht).

Tab. 4 Nutzung von Jungrinderkapazitäten zur Ausdehnung der Milcherzeugung (einzelbetriebliche Kalkulation); Beispiel: Aufstockung des Kuhbestandes von 200 auf 225 Kühe auf Basis der Nutzung vorhandener Jungrinderplätze im Kuhstall (Modellkalkulation)

Ausgangssituation			
100 Jungrinder (wbl.)	Verluste: ~ –350 € / Tier	gesamt:	–35 000 €
200 Kühe	Gewinn: 600 € / Tier	gesamt:	<u>120 000 €</u>
			85 000 €
Erhöhung der Kuhzahl			
75 Jungrinder (wbl.)	Verluste: ~ –350 € / Tier	gesamt:	–26 250 €
225 Kühe	Gewinn: 600 € / Tier	gesamt:	135 000 €
100 Kälber/Jungrinder typisiert (200 €/Tier)		gesamt:	<u>–20 000 €</u>
			88 750 €
	+ Mehrertrag aus dem zusätzlichen Zuchtfortschritt (+ Milch)		

Im Gegensatz zum konventionellen Milchproduzenten wird der „Hochzüchter“, dessen Erlöse vorrangig aus der Embryonen- bzw. Zuchttiervermarktung stammen, künftig regelmäßig (fast) alle Kälber molekulargenetisch bewerten lassen. Diese zusätzlichen Kosten rechnen

sich betriebswirtschaftlich aber nur dann, wenn auch höhere Erlöse aus der späteren Zucht-tiervermarktung damit verknüpft sind. Die Zahl der aktiven „Hochzüchter“ (= Besamungs-bullenerzeuger) dürfte deshalb zukünftig abnehmen, da sich in der „Spitze“ nur diejenigen Zuchtbetriebe permanent halten können, die zu den genetisch wertvollsten Herden (TOP-Herden) dauerhaft gehören.

5. Künftige Entwicklungen

2013 wird das US-genombasierte Zuchtwertschätzsystem offen für alle interessierten Tier-halter. Das eröffnet neue Möglichkeiten:

- jeder Züchter kann Bullenkälber ‚zuchtwertschätzen‘ lassen;
- jeder kann geprüfte Vererber aufstellen und vermarkten;
- alle Länder – auch solche ohne Milchleistungsprüfung – können eigene geprüfte Vererber haben.

Damit sind bäuerliche Zuchtprogramme neuen Wettbewerbern ausgesetzt (vgl. Abb. 7), da der Einstieg von privaten Kapitalanlegern in das Besamungsgeschäft leicht möglich wird.

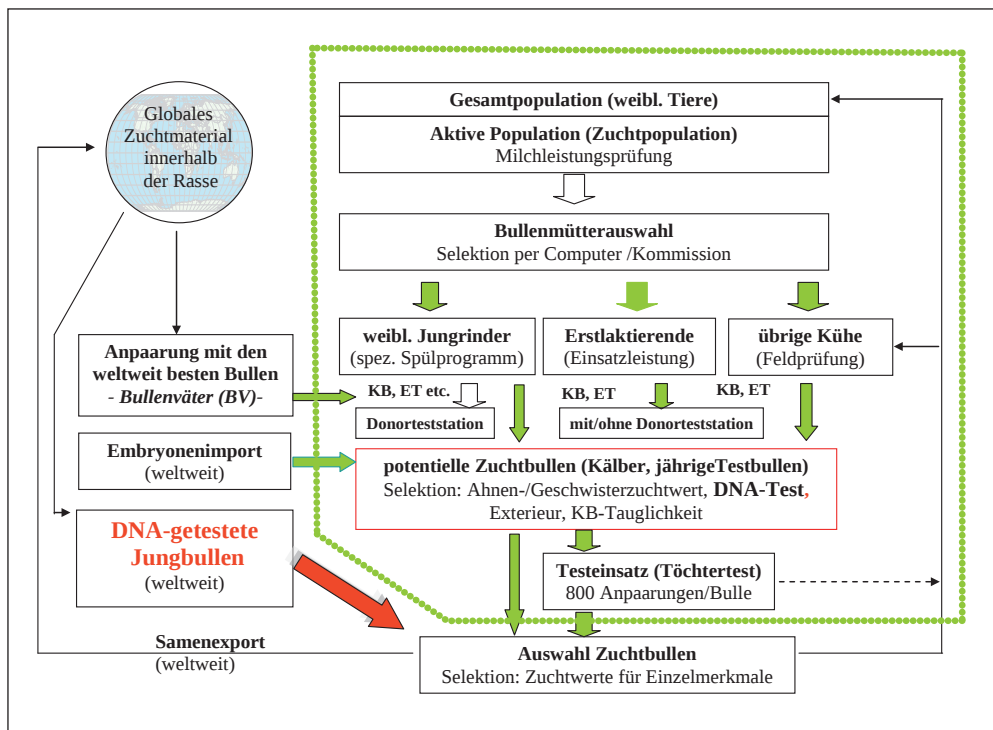


Abb. 7 Schema eines offenen Zuchtprogramms (Milchrinder); *umrahmt mit Punkten*: herkömmliche Leistungs- und Zuchtwertprüfung; *Pfeil unten links (rot)*: Einsatz/Vermarktung DNA-getesteter Bullen aus fremden Zuchtgebieten ohne notwendigen ‚Anschluss‘ an die Leistungsprüfung in der hiesigen Zuchtpopulation (= z. B. private Kapitalanleger); Anmerkung: KB = künstliche Besamung, ET = Embryotransfer

Eine Nachkommenprüfung wird es weiter geben, solange eine regelmäßige Milchleistungsprüfung zur Unterstützung des betrieblichen Managements durchgeführt wird.

Auch eine schnelle Weiterentwicklung von DNA-Chips kann vorhergesagt werden. Noch 2010 wird ein neuer Standardchip mit 800 000 SNP (800 k) verfügbar werden (HD-Chip), der eine bessere Abdeckung des Rinder-genoms sicherstellen dürfte. Gleichzeitig sollten sich die Kosten für eine tierindividuelle Genotypisierung weiter reduzieren, d. h. die Voraussetzungen für eine immer erfolgreichere Nutzung der genom-basierten Bewertung von jungen Selektionskandidaten verbessern sich zunehmend.

Literatur

- BRADÉ, E.: Klimawandel. Neue Herausforderungen für die Züchtung. *Milchpraxis* 46, 84–85 (2008)
- BRADÉ, E., und BRADÉ, W.: Züchtung aus der Blickrichtung einer gezielten Ressourcenschonung: Aufbau einer speziellen Milcheiweiß-Linie bei Holstein. *Rekasan J.* 16/31/32, 66–69 (2009)
- BRADÉ, W.: Mehrstufige Auslese von Bullen bei differenzierter Zuchtzielformulierung und Nutzung verschiedener Informationsquellen. *J. Anim. Breed. Genet.* 109, 16–25 (1992)
- BRADÉ, W., und DISTL, O.: Nutzungsdauer – neue Ansätze zur genetisch-züchterischen Bearbeitung dieses Merkmalskomplexes. Tagung am 23./24. 4. 2009 in Braunschweig „Die Milchkuh im Spannungsfeld von Leistungshöhe, Ernährung und Gesundheit“ (2009a)
- BRADÉ, W., und DISTL, O.: Genombasierte Selektion (Teil 1 und 2). *dlz agrarmagazin* 60/3, 136–139 und 60/4, 120–121 (2009b)
- COCHRAN, W. G.: Improvement by means of selection. *Proc. Second Berkeley Symp. Math. Stat. Prob.*, 449–470 (1951)
- DISTL, O., ROHDE, H., STOCK, K. F., REINHARDT, F., REENTS, R., and BRADÉ, W.: Single nucleotide Polymorphism for German Holstein cows with exceptional long productive life. 60th EAAP Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Barcelona, Spain, 24.–27.08.2009, Kongressbericht No. 15, S. 105 (2009)
- MEYER, H. H. D.: Zucht auf neue Produktionsmerkmale – Lebensmittelbiogenese in einer sich ändernden Welt. *Nova Acta Leopoldina NF* 113/388, 243–258 (2012)
- NIEBEL, E., und FEWSON, D.: Untersuchungen zur Zuchtplanung für die Reinzucht beim Zweinutzungsrind. II Zuchtwahl in zwei Selektionsstufen. *Zeitschrift für Tierz. u. Züchtungsbiol.* 93, 169–177 (1976)

Prof. Dr. Wilfried BRADÉ
Tierärztliche Hochschule Hannover
und LWK Niedersachsen
Fachgebiet Versuchswesen Tier
Johannsenstraße 10
30159 Hannover
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 511 36651501
Fax: +49 511 36651521
E-Mail: wilfried.brade@lwk-niedersachsen.de
brade@fbu-dummerstorf.de

Developmental Origins of Health and Disease: Exposures, Outcome, Mechanisms and Interventions

International Symposium

Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina
in Zusammenarbeit mit dem Alfried Krupp Wissenschaftskolleg Greifswald

Alfried Krupp Wissenschaftskolleg Greifswald
4. bis 6. September 2009

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 112, Nr. 382
Herausgegeben von Marek ZYGMUNT (Greifswald), Hans Georg BENDER
(Düsseldorf) und Wolfgang KÜNZEL (Gießen)
(2011, 119 Seiten, 4 Abbildungen, 6 Tabellen, 21,50 Euro, ISBN: 978-3-8047-2887-5)

Die Beiträge zur internationalen Fachtagung „Developmental Origins of Health and Disease“ (DOHaD) liefern Informationen über den Stellenwert einer gesunden Schwangerschaft, die Notwendigkeit der Prävention von Risikoschwangerschaften und die Auswirkungen einer chronischen Plazentainsuffizienz und der daraus folgenden intrauterinen Wachstumsretardierung. Die DOHaD-Forschung basiert auf epidemiologischen Daten, aus denen klinische, experimentelle und auch epigenetische Studien folgten. Sie zeigen, dass perinatale Ereignisse einen großen Einfluss auf die peri- und postnatale Entwicklung sowie auf die Herausbildung von Krankheiten im Kinder-, Jugend- und Erwachsenen-Alter haben. So sind mit der intrauterinen Wachstumsretardierung vaskuläre und metabolische Veränderungen im adulten Organismus verbunden. Chronische Plazentainsuffizienz und deren Folgen können zu einer Prädisposition für koronare Herzerkrankung, Diabetes mellitus, Schlaganfall, arterielle Hypertonie und Niereninsuffizienz führen, aber auch eine veränderte Knochenentwicklung und ein erhöhtes Risiko für Karzinome werden als Folgeschäden diskutiert. Im Mittelpunkt der Betrachtungen steht die sogenannte „fetale Programmierung“ in kritischen Phasen des intrauterinen Wachstums. Negative Einflüsse während dieser Wachstumsphasen können zu Langzeitschäden und strukturellen Veränderungen führen. Die resultierenden Kompensationsmechanismen werden bis in die nächste Generation epigenetisch weitervererbt. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

Volkswirtschaftliche Konsequenzen der Anwendung/ Unterlassung der Genanalyse am Beispiel der Zucht auf TSE-Resistenz beim Schaf

Gesine LÜHKEN und Georg ERHARDT (Gießen)

Mit 10 Abbildungen und 5 Tabellen

Zusammenfassung

Die als Scrapie oder Traberkrankheit bezeichnete transmissible spongiforme Enzephalopathie (TSE) wird beim Schaf seit einigen Jahren auch durch Selektion auf bestimmte Allele des Prionprotein-Gens (*PRNP*) bekämpft. Dies wird sowohl für die tierseuchenrechtlichen Maßnahmen in von Scrapie betroffenen Schafherden als auch für die TSE-Resistenzzucht bei Herdbuchschafen über gesetzliche Vorgaben der Europäischen Kommission geregelt. Die ökonomischen Konsequenzen der Anwendung oder Unterlassung der *PRNP*-Genotypisierung und -Selektion beim Schaf betrafen und betreffen vor allem Besitzer von Scrapie-positiven Schafherden, Tierseuchenkassen, Schafzüchter und Schafzuchtverbände, aber auch Biotechnik-Unternehmen und Forschungseinrichtungen. Von 2002 bis Mitte 2007 wirkte sich die *PRNP*-Genotypisierung und -Selektion in von Scrapie betroffenen Schafherden im Vergleich zur Keulung der kompletten Herde ab einem Anteil von etwa 10 % aufgrund ihres *PRNP*-Genotyps nicht zu keulender Schafe ökonomisch positiv für die Tierbesitzer und die Tierseuchenkassen aus. Seit Mitte Juni 2007 gilt dies aufgrund der neueren gesetzlichen EU-Vorgaben nur noch für die in Deutschland selteneren klassischen Scrapiefälle. Mit Beginn der TSE-Resistenzzucht konnten Zuchttiere einiger Schafrassen, die den *PRNP*-Haplotyp ARR trugen, deutlich teurer verkauft werden. Durch den Rückzug einiger Landesschafzuchtverbände von der Selektion auf ARR bei bestimmten Schafrassen wurden dort diese Preisunterschiede nivelliert und der bisher geleistete ökonomische Aufwand vor allem der Tierseuchenkassen und Zuchtverbände wird sich für diese Schafrassen im Endeffekt möglicherweise nicht auszahlen.

Abstract

For several years, Scrapie, a transmissible spongiform encephalopathy (TSE), has also been combated in sheep by selection for distinct alleles of the prion protein gene (*PRNP*). This is being determined both in the case of scrapie-affected flocks and in sheep breeding by regulations of the European Commission. Economical consequences of application or non-application of *PRNP* genotyping and selection in sheep mostly affected and still affects owners of scrapie-positive sheep flocks, federal animal health insurance funds, sheep breeders, and breeding organizations, but also biotechnological companies and research institutes. From 2002 until the middle of 2007, *PRNP* genotyping and selection in scrapie-affected sheep flocks had been economically favourable for flock owners and animal health insurance funds compared to culling the complete flock in case that approximately 10 or more percent of the sheep had not to be culled due to their *PRNP* genotype. Since the middle of 2007, this applies only to the – in Germany – rarer classical scrapie cases due to novel EU regulations. In the beginning of breeding for TSE resistance, sheep of distinct breeds carrying the *PRNP* haplotype ARR could be sold for higher prices. The withdrawal of some breeding organizations from selection for ARR in certain sheep breeds leads to equalization of these price differences and eventually here the economical input particularly of the animal health insurance funds and breeding organizations may not pay off.

1. Hintergrund und Entwicklung der Zucht auf TSE-Resistenz beim Schaf

Scrapie (Traberkrankheit, Tremblante) wurde schon 1732 beim Schaf beschrieben (McGOWAN 1922) und ist somit die am längsten bekannte transmissible spongiforme Enzephalopathie (TSE). Es handelt sich dabei um eine degenerative, sehr langsam, aber stets letal verlaufende Erkrankung des zentralen Nervensystems, an der DNA-freie Proteinpartikel, sogenannte Prionen (PrP^{Sc}), beteiligt sind (PRUSINER 1982, YOKOYAMA und MOHRI 2008). Der Anteil Scrapie-positiver Schafe in betroffenen Herden kann sehr niedrig sein (<1 %), in Beständen mit endemischer Scrapie aber auch Verluste von 3–5 % pro Jahr verursachen. Nur in Ausnahmefällen wurden Mortalitäten von bis zu 50 % beobachtet (TOUMAZOS 1991, ELSSEN et al. 1999, DETWILER 2001).

Scrapie ist die am weitesten verbreitete TSE bei Nutztieren (COSSEDDU et al. 2007). Weltweit gelten nur wenige Länder als frei von Scrapie. Im 19. Jahrhundert und vor dem Zweiten Weltkrieg war Scrapie in Deutschland eine sehr häufige Tierseuche. Demgegenüber wurde zwischen 1945 und 1985 kein Scrapie-Fall beobachtet, während bis 2000 nur Einzelfälle diagnostiziert wurden (BUSCHMANN und GROSCHUP 2005). Zwischen EU-Ländern gab und gibt es allerdings deutliche Unterschiede hinsichtlich des Auftretens von Scrapie. In den Jahren von 1998 bis 2000 wurden beispielsweise in Deutschland und auch in Österreich und Spanien nur jeweils 5 Scrapie-Fälle registriert, während Frankreich (97 Fälle), Griechenland (130 Fälle), Italien (208 Fälle) und vor allem das Vereinigte Königreich (1664 Fälle) deutlich stärker von Scrapie betroffen waren.

Scrapie selbst steht nicht im Verdacht, auf den Menschen übertragbar zu sein (CONCEPCION et al. 2005). Allerdings gilt die Entstehung der bovinen transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (BSE) durch die Verfütterung von unzureichend erhitztem Tiermehl, das von Scrapie-infizierten Schafen stammte, als erwiesen (WILESMITH et al. 1988). Die Hinweise auf Zusammenhänge zwischen BSE beim Rind und Fällen der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) beim Menschen (BRUCE et al. 1997) sowie das nicht auszuschließende Vorkommen von BSE auch bei Schafen und Ziegen rückten schließlich auch die Scrapie bzw. TSE-Erkrankungen der kleinen Wiederkäuer in den Fokus des Verbraucherschutzes. Mit der Verordnung 999/2001/EG vom 22. Mai 2001 wurden EU-weit grundlegende Maßnahmen zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien erlassen. Jeder Mitgliedsstaat ist demnach verpflichtet, BSE- und Scrapie-Überwachungsprogramme durchzuführen, in deren Rahmen jährlich eine bestimmte Mindestanzahl von geschlachteten, verendeten und getöteten Schafen und Ziegen, die über 18 Monate alt sind, mittels Schnelltest auf das Vorliegen einer TSE untersucht wird. Mit der Einführung der aktiven TSE-Überwachung in der Europäischen Union ab April 2002 kam es in Deutschland zu einem sprunghaften Anstieg der Anzahl identifizierter Scrapie-positiver Schafe (Abb. 1). Von 2002 bis 2009 waren dies durchschnittlich knapp 40 als Scrapie-positiv identifizierte Schafe pro Jahr, wobei dies von nur 7 im Jahr 2008 bis zu 120 im Jahr 2004 variierte. 2003 waren Dänemark, Finnland, Luxemburg und Österreich die einzigen EU-Mitgliedstaaten, in denen trotz der aktiven TSE-Überwachung keine Neuausbrüche von Scrapie festgestellt wurden (European Commission 2004).

Indessen mehrten sich die im Rahmen sowohl grundlagenorientierter als auch empirischer Untersuchungen gewonnenen Hinweise auf eine Möglichkeit, Scrapie bzw. TSEs zumindest beim Schaf auf einem anderen Weg und effektiver bekämpfen zu können. Schon 1755 wurde berichtet, dass Scrapie entweder gehäuft oder besonders selten in bestimmten

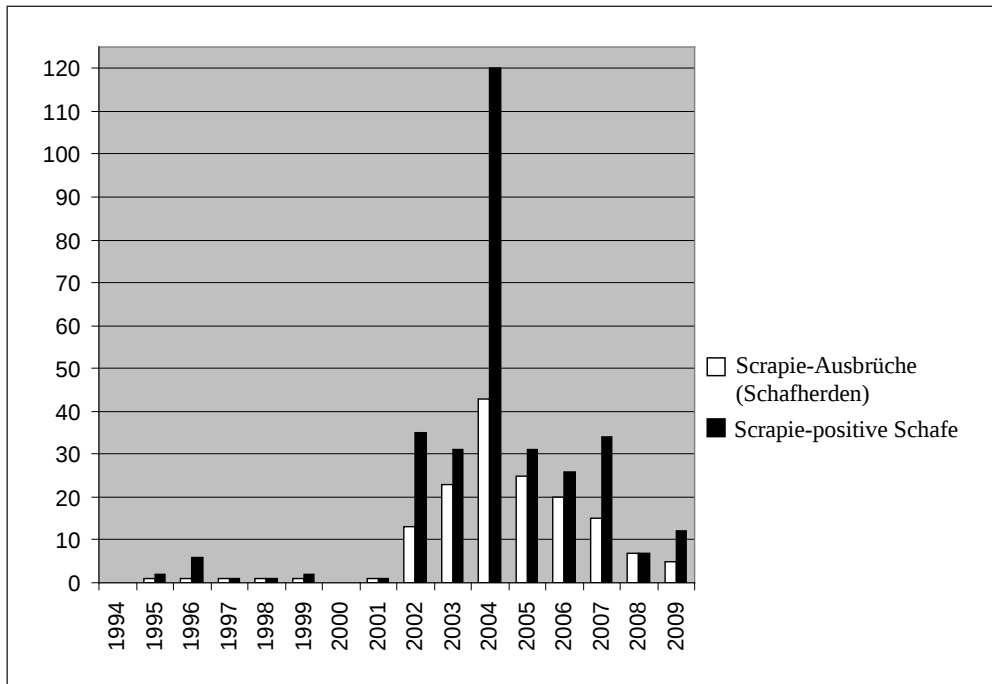


Abb. 1 Anzahl der Scrapie-Ausbrüche (von Scrapie betroffene Schafherden) und der Scrapie-positiven Schafe in Deutschland in den Jahren von 1994 bis 2009

Schafflinien oder -rassen auftreten kann (*Anonymus* 1755). Allerdings wurden erst vor rund 15 Jahren im Prionprotein-Gen (*PRNP*) des Schafes Varianten identifiziert, die zum Teil zu Aminosäureaustauschen im körpereigenen Prionprotein (PrP^C) führen und mit der Resistenz der Tiere gegenüber Scrapie in Zusammenhang stehen (HUNTER et al. 1993, GOLDMANN et al. 1994, BELT et al. 1995). Für die Aminosäurevarianten an den Positionen 136 (A oder V), 154 (R oder H) und 171 (Q, R oder H) des Prionproteins konnten durch molekulargenetische Untersuchungen an von Scrapie betroffenen Schafen vor allem im Vereinigten Königreich (DAWSON et al. 1998), aber auch in anderen europäischen Ländern Zusammenhänge mit der Empfänglichkeit für Scrapie beobachtet werden. Die aus den hauptsächlich vorkommenden *PRNP*-Haplotypen A₁₃₆R₁₅₄R₁₇₁ (ARR), AHQ, ARQ, ARH und VRQ resultierenden Genotypen wurden in unterschiedlichen Häufigkeiten bei Scrapie-positiven Schafen beobachtet und auf dieser Grundlage nach dem *National Scrapie Plan* (NSP) des Vereinigten Königreiches in Risikoklassen oder -gruppen von 1 bis 5 eingeteilt (Tab. 1). Der Genotyp ARR/ARR wurde in die Gruppe 1 mit der geringsten Empfänglichkeit eingestuft. Genotypen mit mindestens einem VRQ-Haplotyp und ohne ARR-Haplotyp wurden in die Risikogruppe 5 mit der höchsten Scrapie-Empfänglichkeit eingeteilt. Alle anderen Genotypen befinden sich in den Gruppen 2 bis 4. In Deutschland wurde diese Klassifizierung der *PRNP*-Genotypen übernommen; hier spricht man jedoch in der Regel von Genotyp (G)-Klassen.

Die oben beschriebene Situation hinsichtlich des Vorkommens und der Bedeutung von Scrapie und die neu entdeckte Möglichkeit der Bekämpfung durch Selektion auf bzw. ge-

Tab. 1 Risikobewertung von *PRNP*-Genotypen nach dem *National Scrapie Plan* (NSP, UK; <http://www.defra.gov.uk>)

NSP-Gruppe	Genotypen	Risikobewertung
NSP 1	ARR/ARR	höchste genetische Scrapie-Resistenz
NSP 2	ARR/ARQ, ARR/ARH, ARR/AHQ	genetische Scrapie-Resistenz
NSP 3 (ARQ/ARQ)	ARQ/ARQ	niedrige genetische Scrapie-Resistenz (vorläufige Einstufung von ARQ/ARQ in NSP3)
NSP 3 (andere)	AHQ/AHQ, ARH/ARH, ARH/ARQ, AHQ/ARH, AHQ/ARQ	
NSP 4	ARR/VRQ	genetische Scrapie-Empfänglichkeit
NSP 5	ARQ/VRQ, ARH/VRQ, AHQ/VRQ, VRQ/VRQ	hohe genetische Scrapie-Empfänglichkeit

Die Einteilung der *PRNP*-Genotypen in G-Klassen in Deutschland entspricht dem NSP-Schema.

gen bestimmte *PRNP*-Genotypen führten Ende 2002 und Anfang 2003 zu Änderungen bzw. Ergänzungen der gesetzlichen Vorgaben der Europäischen Union bezüglich der TSE-Bekämpfung bei kleinen Wiederkäuern (im engeren Sinne beim Schaf) und der Herdbuch-Schafzucht: Mit dem Inkrafttreten der EU-Verordnung 206/2003 zur Änderung der Verordnung 999/2001 war es ab Anfang 2003 in von Scrapie betroffenen Schafherden möglich, auf eine Keulung aller Schafe zu verzichten. Stattdessen konnte nach der Feststellung des *PRNP*-Genotyps aller Schafe in Abhängigkeit vom Ergebnis ein Teil der Schafe weiter genutzt oder wenigstens geschlachtet werden, so dass die Notwendigkeit zur Keulung nur noch bei Schafen mit bestimmten *PRNP*-Genotypen bestand (Tab. 2). Die im Sommer 2004 verabschiedete EU-Verordnung 1492/2004 zur Änderung der Verordnung 999/2001 ermöglichte zusätzlich u. a. in Beständen mit niedriger ARR-Frequenz oder zur Vermeidung von Inzucht das Aufschieben der Keulung und die weitere Nutzung für fünf Zuchtjahre von weiblichen Schafen, die *PRNP*-Genotypen ohne ARR, allerdings auch ohne VRQ, tragen (sogenannte Aufschieberegelung).

Tab. 2 Tierseuchenrechtlicher Umgang mit Schafen aus von Scrapie betroffenen Schafherden in Abhängigkeit vom festgestellten *PRNP*-Genotyp, basierend auf den EU-Verordnungen 206/2003 und 1492/2004

<i>PRNP</i> -Genotyp (NSP-Gruppe)	weitere Nutzung als Elterntiere	Schlachterlaubnis	Keulung
ARR/ARR (1)	♀ und ♂	♀ und ♂	
ARR/XXX (2)	♀	♀ und ♂	
XXX/XXX (3)	♀ (für 5 Zuchtjahre bei Anwendung der Aufschieberegelung)		♀ (sofort, wenn keine Anwendung der Aufschieberegelung) und ♂
ARR/VRQ (4)		♀ und ♂	
XXX/VRQ, VRQ/VRQ (5)			♀ und ♂

XXX = ARQ, AHQ, ARH oder ARK; ♀, Mutterschafe und -lämmer; ♂, Böcke und Bocklämmer

Mit der im Jahr 2003 durchgeführten Erhebung zur Frequenz des *PRNP*-Genotyps ARR/ARR in den bedeutenden Schafrassen aller EU-Mitgliedstaaten (Entscheidung 2002/1003/EG) wurde eine wichtige Voraussetzung zur Aufstellung von Programmen zur Züchtung von Schafen auf TSE-Resistenz erfüllt, deren Mindestanforderungen mit der Entscheidung 2003/100 festgelegt und im Laufe der folgenden Jahre in den einzelnen EU-Ländern in nationales Recht umgesetzt wurden. Diese Mindestanforderungen gelten für die Herdbuchzucht der in den jeweiligen EU-Ländern heimischen oder bedeutenden Rassen und schreiben u. a. vor, dass nur gekennzeichnete und genotypisierte Böcke zur Zucht eingesetzt werden dürfen und dass Böcke mit dem *PRNP*-Haplotyp VRQ zu schlachten sind; allerdings auch, dass für bedrohte Rassen und für Rassen mit niedriger ARR-Frequenz Sonderregelungen getroffen werden können. Die Umsetzung der Entscheidung 2003/100 in deutsches Recht wurde erst zum Oktober 2005 durch die sogenannte TSE-Resistenzzuchtverordnung verwirklicht (BgbI 2005 Teil 1 Nr. 66). Allerdings wurden in Deutschland bereits ab 2002/2003 bei bestimmten Schafrassen und in einigen Zuchtverbänden Zuchttiere auf den *PRNP*-Genotyp hin untersucht; im Vereinigten Königreich startete bereits 2001 das *ram genotyping scheme*.

Nachdem die Selektion auf *PRNP*-Genotypen EU-weit sowohl in der aktiven Tierseuchenbekämpfung als auch in der Herdbuchschafzucht eingeführt worden war, wurden in Deutschland und auch in anderen EU-Ländern Scrapie-positive Schafe identifiziert, die den als resistent geltenden *PRNP*-Genotyp ARR/ARR trugen (MADEC et al. 2004, ORGE et al. 2004, LÜHKEN et al. 2007). Bei diesen Fällen wurde – teilweise retrospektiv – atypische Scrapie diagnostiziert. Diese unterschied sich von der bisher bekannten klassischen Scrapie auf histopathologischer und molekularer Ebene (BENESTAD et al. 2003, BUSCHMANN et al. 2004) und zeichnete sich epidemiologisch vor allem dadurch aus, dass in der Regel nur ein Schaf, seltener mehrere Schafe pro Herde als Scrapie-positiv identifiziert wurden, die betroffenen Tiere im Alter meistens deutlich über dem Durchschnitt der von klassischer Scrapie betroffenen Schafe lagen (LÜHKEN et al. 2007) und nicht zuletzt die Verteilung der *PRNP*-Genotypen bei atypisch Scrapie-positiven Schafen eine andere war als bei klassisch Scrapie-positiven Schafen (Abb. 2). In Deutschland wurde von 2002 bis 2009 bei mehr als 85 % der von Scrapie betroffenen Schafherden atypische Scrapie nachgewiesen (Abb. 3). Überwiegend atypisch Scrapie-positive Schafe (ohne im Rahmen von Keulungsmaßnahmen identifizierte) meldeten zwischen 2004 und 2008 auch Portugal, Norwegen, Schweden und Belgien, während in Frankreich erst ab 2007 mehr atypisch als klassisch Scrapie-positive Schafe identifiziert wurden und im Vereinigten Königreich, Griechenland, den Niederlanden, Italien und Spanien weiterhin bei den meisten und in Zypern bei allen der Scrapie-positiven Schafe klassische Scrapie nachgewiesen wurde (European Commission 2008).

Obwohl die Möglichkeit der Übertragbarkeit der atypischen Scrapie experimentell nachgewiesen wurde (LE DUR et al. 2005), wurde nach einer Risikobewertung durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), sicherlich auch gefördert durch die Entwicklung von Methoden zur eindeutigen Unterscheidung atypischer Scrapiefälle von anderen ovinen TSE-Formen (BUSCHMANN et al. 2004, GRETZSCHEL et al. 2005), schließlich im Juni 2007 die Verordnung 999/2001 durch die Verordnung 727/2007 abgelöst. Diese ermöglichte bei Feststellung von atypischer Scrapie in einem Schafbestand einen Verzicht auf die Herdenkeulung, auch ohne Feststellung des *PRNP*-Genotyps, unter gewissen Auflagen, wie eine mehrjährige Kontrolle des Tierbestands und -verkehrs und die Durchführung von TSE-Schnelltests bei allen Schafen, die in einem Alter von über 1,5 Jahren geschlachtet werden. Diese Verordnung wurde im Sommer 2008 durch die Verordnung 776/2008 ersetzt,

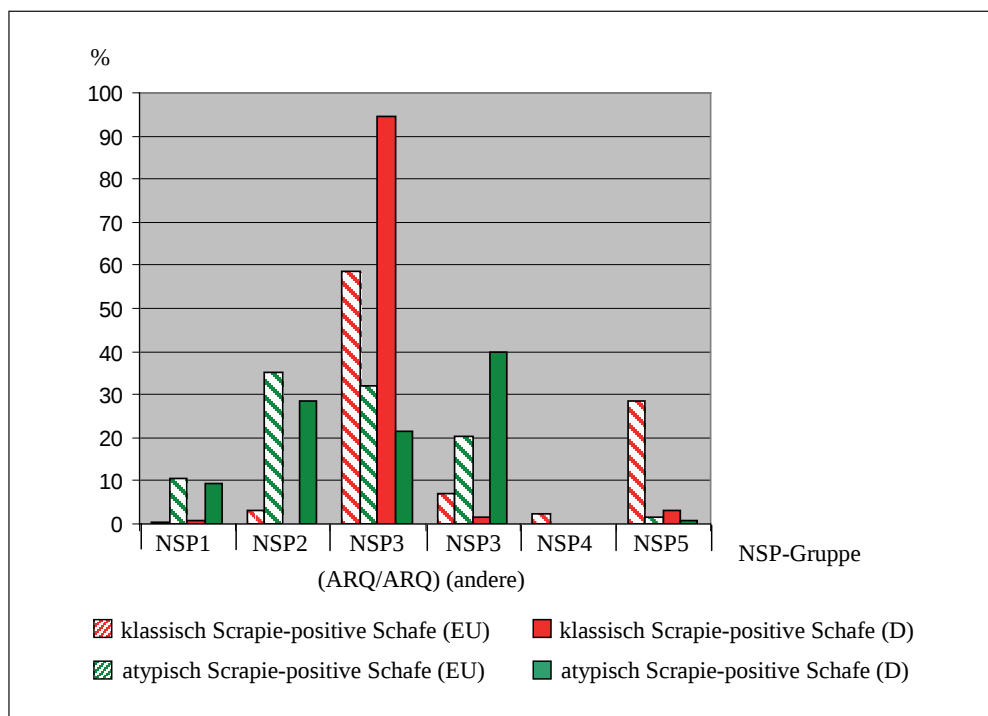


Abb. 2 Verteilung (%) der *PRNP*-Genotypen klassisch und atypisch Scrapie-positiver Schafe in den EU-Mitgliedsstaaten (EU) (European Commission 2008) und in Deutschland (D) nach NSP-Gruppen, 2002–2008

die es nun auch im Fall von klassischer Scrapie und unter bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise einer sehr niedrigen ARR-Frequenz in der Herde, ermöglicht, auf eine Selektion auf den *PRNP*-Genotyp bei den Mutterschafen zu verzichten, wobei allerdings der Einsatz von Zuchtböcken mit ARR/ARR weiterhin verpflichtend ist. Den EU-Verordnungen 727/2007 bzw. 776/2008 wurden die in der Entscheidung 2003/100 formulierten Mindestanforderungen zur Aufstellung von Programmen zur Züchtung von Schafen auf TSE-Resistenz angehängt, so dass diese seit Mitte 2007 direkte Gültigkeit in den EU-Mitgliedsstaaten haben.

2. Volkswirtschaftliche Auswirkungen der Anwendung oder Unterlassung der Selektion auf den *PRNP*-Genotyp

Im Folgenden werden unter „Selektion auf den *PRNP*-Genotyp“ sowohl das Vorgehen in der Herdbuchschafzucht als auch die vom Ergebnis der *PRNP*-Genotypisierung abhängigen tierseuchenrechtlichen Maßnahmen in den von Scrapie betroffenen Schafherden verstanden. Die Anwendung oder Unterlassung der Genotypisierung hatte in mehrfacher Hinsicht ökonomische Konsequenzen, vor allem für Besitzer von Scrapie-positiven Schafherden, Tierseuchenkassen, Schafzüchter und Schafzuchtverbände, aber auch (Biotechnik-) Unternehmen und Forschungseinrichtungen.

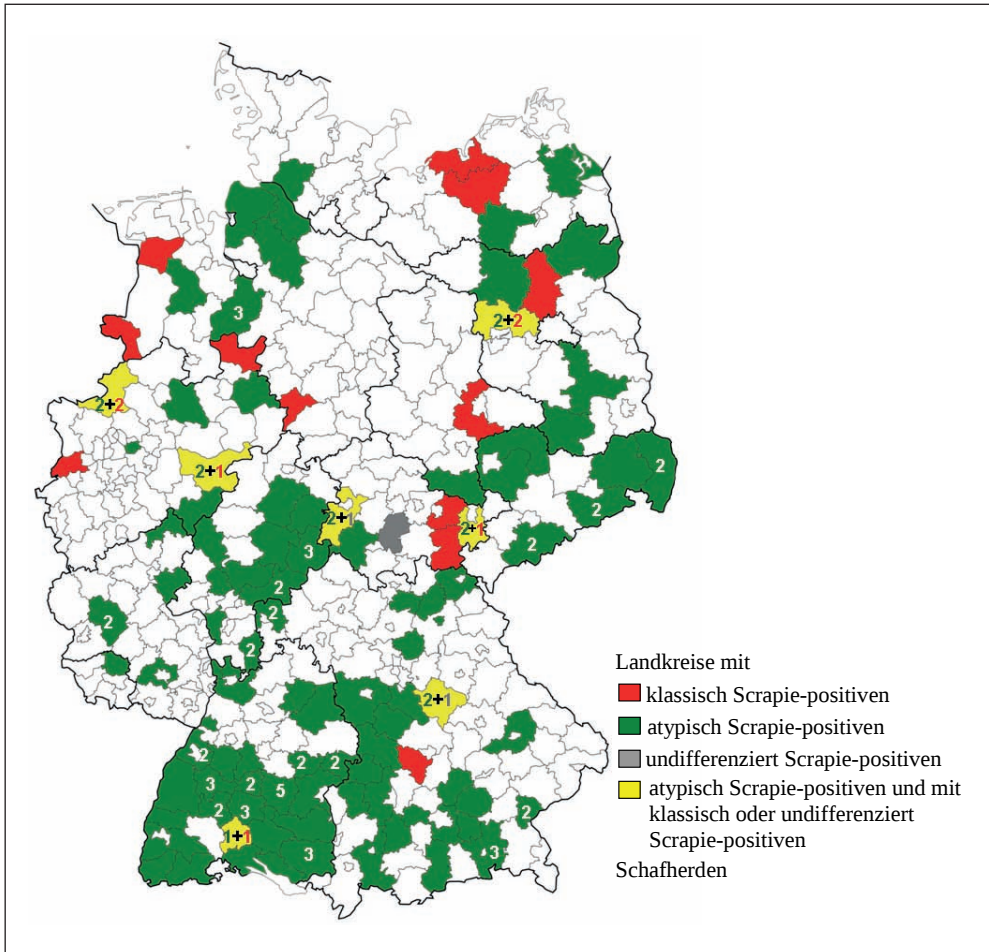


Abb. 3 Ausbrüche atypischer, klassischer und undifferenzierter Scrapie beim Schaf in Deutschland (2002–2009). Das Auftreten mehrerer Scrapie-Ausbrüche im selben Landkreis ist durch Zahlen dargestellt.

Die in Deutschland von 2002 bis 2009 als Scrapie-positiv identifizierten Schafe stammten aus 155 Beständen. In 19 dieser Bestände wurde klassische Scrapie nachgewiesen, in fast allen anderen atypische Scrapie, und in einigen wenigen Beständen konnte der Scrapie-Typ nicht eindeutig bestimmt werden. Insgesamt fielen in diesem Zeitraum rund 60 000 Schafe aus den von Scrapie betroffenen Beständen unter die entsprechenden tierseuchenrechtlichen Bestimmungen. Davon gehörten rund 50 000 Schafe den von atypischer Scrapie betroffenen Herden an. Außer im Jahr 2007 war die Anzahl der Schafe aus von atypischer Scrapie betroffenen Schafherden immer deutlich höher als die der Schafe aus von klassischer Scrapie betroffenen Herden (Abb. 4). Dies war nicht etwa bedingt durch unterschiedliche durchschnittliche Herdengrößen (bei atypischer Scrapie durchschnittlich 364 und bei klassischer Scrapie durchschnittlich 535 Schafe pro Herde), sondern durch das deutlich seltenere Auftreten der klassischen Scrapie im Vergleich zur atypischen Scrapie in Deutschland (Abb. 3).

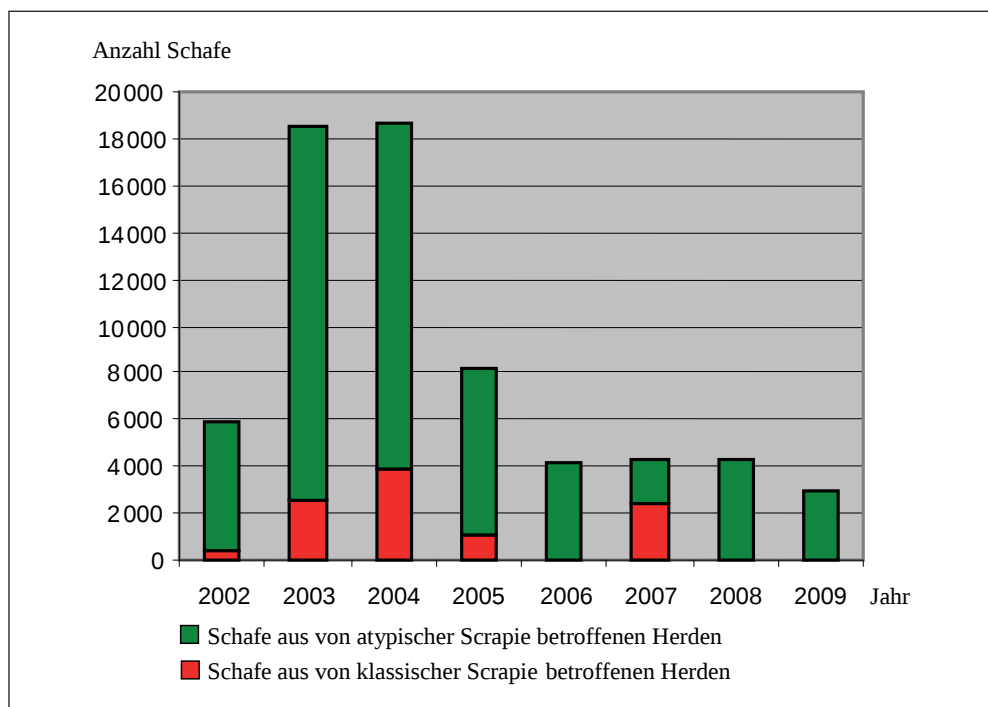


Abb. 4 Anzahl der Schafe von mit klassischer und atypischer Scrapie betroffenen Herden pro Jahr in Deutschland (2002–2009)

Von 2002 bis Mitte 2007 war für die ökonomische Bewertung der *PRNP*-Genotypisierung in einer von Scrapie betroffenen Schaferde die Differenzierung des Scrapietyps aufgrund der oben beschriebenen gesetzlichen Vorgaben nicht relevant. Bei Verzicht auf eine Genotypisierung mussten alle Schafe des betroffenen Bestands gekeult und unschädlich beseitigt werden. Zwischen 2002 und 2006 hätte dies rund 49 000 Schafe betroffen. Bereits seit Oktober 2002 wurde in Deutschland – von wenigen Ausnahmen abgesehen – auf die Keulung gesamter von Scrapie betroffener Schaferden verzichtet. Bei einer geschätzten durchschnittlichen Entschädigungssumme von 125 Euro pro gekeultem Schaf durch die Tierseuchenkasse – wobei dies vor allem bei Zuchttieren oft eine nicht adäquate Entschädigung darstellt – und durchschnittlichen Kosten für die Genotypisierung inklusive Kennzeichnung von 12 Euro pro Schaf (ohne Kosten für die Probennahme, die meistens durch die zuständigen Veterinärbehörden durchgeführt wurde) ergibt sich anhand dieser Kalkulation bei ausschließlicher Betrachtung der Kosten eine Rentabilität der Genotypisierung, sobald etwa 10% der Schafe nicht gekeult werden müssen. Nicht gekeult werden mussten alle Schafe, die den *PRNP*-Haplotyp ARR mindestens mischerbig trugen (Tab. 2). Die im Jahr 2003 durchgeführte Erhebung zur Frequenz des *PRNP*-Genotyps ARR/ARR in den bedeutenden Schafrassen aller EU-Mitgliedstaaten hatte auch zwischen den deutschen Schafrassen erhebliche Unterschiede aufgezeigt (Tab. 3). Daher wird der Anteil nicht zu keulender Schafe in den betroffenen Herden vor allem durch deren Rassezusammensetzung und den *PRNP*-Genotyp der eingesetzten Zuchtböcke bestimmt.

Mit den folgenden Fallbeispielen (Tab. 4) soll die Bedeutung der ARR-Frequenz und einiger weiterer Faktoren für die Rentabilität der *PRNP*-Genotypisierung für drei in 2003 und 2004 von atypischer Scrapie betroffene Schafherden verdeutlicht werden: Für die Schafherde 1 mit 1350 Schafen ergab sich durch die Rassenzusammensetzung (vor allem Schwarzköpfiges Fleischschaf und Suffolk, vgl. Tab. 3) eine günstige Verteilung der *PRNP*-Genotypen, bei der rund 86 % der Schafe rein- oder mischerbig den Haplotyp ARR und nicht VRQ trugen (Tab. 4). Dagegen zeigte sich sowohl in der Herde 2 mit 448 Merinolandschafen als auch in Herde 3 mit 168 Ostfriesischen Milchschaften eine – zu dieser Zeit – für beide Rassen typische relativ niedrige ARR-Frequenz (vgl. Tab. 3), wobei nur 4 % (Herde 2) bzw. 3,6 % (Herde 3) der Schafe wenigstens mischerbig ARR trugen (Tab. 4). Vergleicht man die Kosten für eine Entschädigung bei Keulung aller Schafe mit den Kosten für die *PRNP*-Genotypisierung (ohne Material) und Entschädigung bei Keulung nur eines Teils der Schafe (Tab. 4), so ergibt sich für Herde 1 eine Kosteneinsparung von rund 132 000 Euro bei Durchführung der Genotypisierung und der anschließenden Keulung von nur rund 14 % der Schafe. Für die Herden 2 und 3 ergeben sich jeweils zusätzliche Kosten von rund 1000 Euro bei Durchführung der Genotypisierung und der anschließenden Keulung von rund 94 % bzw. 96 % der Schafe im Vergleich zu einer Herdenkeulung ohne vorherige Genotypisierung. Allerdings wurde in Herde 2 die seit Mitte 2004 mögliche Aufschieberegelung angewendet, so dass auch die Mutterschafe mit NSP3-Genotypen für fünf Zuchtjahre in der Herde weitergenutzt werden konnten. Schafherde 3 wurde wegen Betriebsaufgabe vollständig gekeult. Anders als die generelle Nutzung der *PRNP*-Genotypisierung wurde die Aufschieberegelung – auch bedingt durch die Situation in den betroffenen Herden – in den einzelnen Bundesländern unterschiedlich häufig angewendet, wie Abbildung 5 für die Scrapie-Ausbrüche in den Jahren von 2003 bis 2006 in vier Bundesländern zeigt. Von 2002 bis Mitte 2007 waren durchschnittlich knapp 50 % der Schafe in von Scrapie betroffenen Schafherden mindestens mischerbig für ARR, ohne den VRQ-Haplotyp zu tragen. Der ökonomische Vorteil der Genotypisierung ging jedoch ab Juni 2007 durch die Möglichkeit, in atypisch Scrapie-positiven Schafherden auch ohne Selektion auf den *PRNP*-Genotyp auf die Keulung von Schafen zu verzichten und gleichzeitig seltenem Auftreten klassischer Scrapiefälle in Deutschland weitgehend verloren.

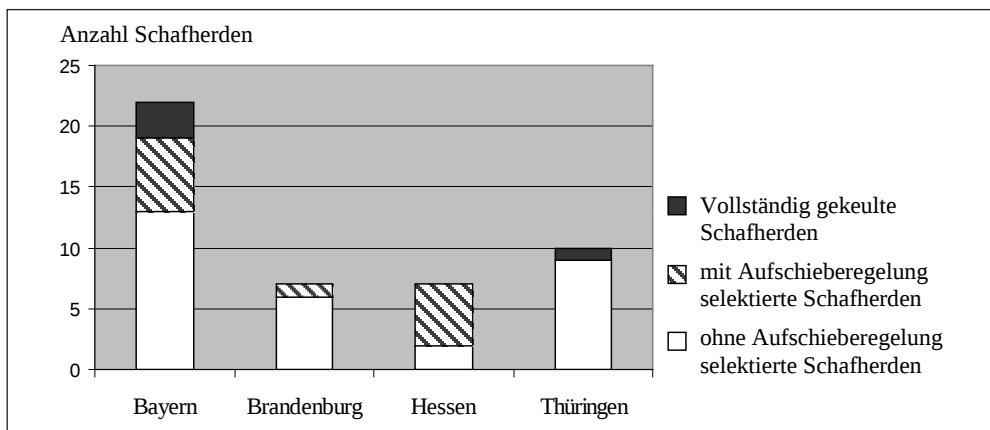


Abb. 5 Anzahl der nach *PRNP*-Genotypisierung ohne oder mit Anwendung der Aufschieberegelung selektierten und der vollständig gekeulten Scrapie-positiven Schafherden in verschiedenen Bundesländern (2003–2006)

Tab. 3 Verteilung (%) der *PRNP*-Genotypen in die NSP-Gruppen bei einigen Schafrassen in Deutschland, ermittelt im Rahmen der EU-Statuserhebung im Jahr 2003 (*European Commission* 2004)

Schafrasse	Anteil (%) der <i>PRNP</i> -Genotypen in NSP-Gruppe					
	1	2	[1+2]	3	4	5
Schwarzköpfiges Fleischschaf	60,0	36,0	[96,0]	4,0	0,0	0,0
Suffolk	33,0	51,0	[84,0]	13,0	1,0	1,0
Merinolandschaf	1,8	24,6	[26,4]	73,6	0,0	0,0
Ostfriesisches Milchschaaf (weiß)	1,2	19,3	[20,5]	78,3	0,0	1,2

Tab. 4 Genetische Situation und geschätzte Kosten der durchgeführten tierseuchenrechtlichen Maßnahmen bei drei von atypischer Scrapie betroffenen Schaferden (Deutschland, 2003/2004)

	Schaferde 1	Schaferde 2	Schaferde 3
Rasse / Rassenzusammensetzung	Schwarzköpfiges Fleischschaf und Suffolk	Merinolandschaf	Ostfriesisches Milchschaaf, weiß
Herdengröße (n)	1350	448	168
Herdenzusammensetzung	1298 Mutterschafe und weibliche Zutreter	244 Mutterschafe 201 Lämmer 3 Böcke	91 Mutterschafe 76 Lämmer 1 Bock
geschätzte Genotypisierungskosten	13 350 Euro + Material für Probenahme	4500 Euro + Material für Probennahme	ca. 1700 Euro + Material für Probennahme
Ergebnis der Genotypisierung: Verteilung (%) der <i>PRNP</i> -Genotypen in NSP-Gruppen			
NSP 1 (ARR/ARR)	47,7	–	–
NSP 2 (ARR/XXX)	38,1	6,0	3,6
NSP 3 (XXX/XXX)	14,0	93,8	96,4
NSP 4 (ARR/VRQ)	0,1	–	–
NSP 5 (XXX/VRQ, VRQ/VRQ)	0,2	0,2	–
geschätzte Entschädigung bei Keulung der Schafe NSP 3–5	23 125 Euro	52 625 Euro	20 250 Euro
geschätzte Entschädigung bei Keulung <i>aller</i> Schafe	168 750 Euro	56 000 Euro	21 000 Euro
Entscheidung nach Genotypisierung	Keulung der Schafe NSP 3–5	Anwendung der Aufschieberegelung	Keulung aller Schafe (Betriebsaufgabe)

XXX = ARQ, AHQ, ARH oder ARK

In der Herdbuchzucht entstanden durch die Genotypisierung von Böcken und teilweise auch von Mutterschafen von 2001 bis 2006 geschätzte Kosten von knapp 1 800 000 Euro (H.-J. RÖSLER, persönliche Mitteilung). Diese wurden in unterschiedlichen Anteilen von den Landdesschafzuchtverbänden (LSV) und von Dritten getragen (Abb. 6). An der Finanzierung durch Dritte waren vor allem die Tierseuchenkassen verschiedener Bundesländer beteiligt, aber teilweise auch Ministerien (z. B. Thüringen), Träger von Forschungsprojekten und auch Tierhalter unabhängig vom Zuchtverband. Die Genotypisierungskosten der Zuchtverbände in Baden-Württemberg, Hessen und Rheinland-Pfalz wurden von 2001 bis 2006 vollständig von

Dritten getragen (in Hessen beispielsweise durch die Tierseuchenkasse), während der LSV Niedersachsen, der Lüneburger Heidschnuckenzuchtverband und der LSV Weser-Ems in diesem Zeitraum die Genotypisierung selbst finanzierten (Abb. 7). In Thüringen wird seit 2004 der Ankauf von Zuchtböcken der G-Klassen 1 oder 2 bzw. seit 2009 nur noch der G-Klasse 1 durch die Tierseuchenkasse bezuschusst, um die Einbindung der Gebrauchsherden in die Scrapie-Resistenzucht zu fördern und das Risiko hoher Entschädigungsleistungen durch Keulungen im Seuchenfall zu minimieren.

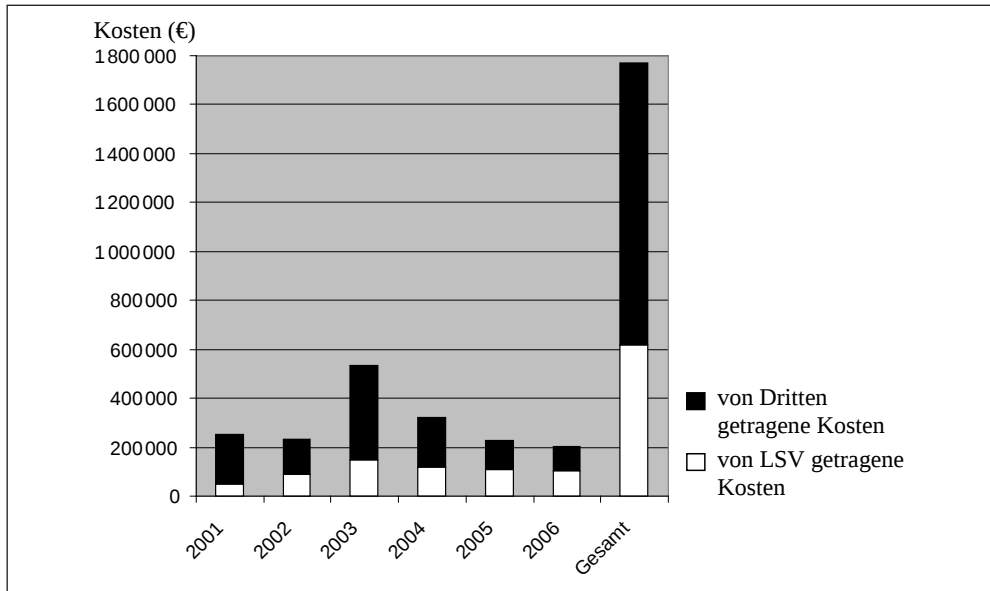


Abb. 6 Kosten für die PRNP-Genotypisierung von Zuchtschafen in Deutschland von 2001–2006 (H.-J. RÖSLER, persönliche Mitteilung). Dritte: vor allem Tierseuchenkassen, z. T. auch Träger von Forschungsprojekten, Ministerien, Tierhalter unabhängig vom Zuchtverband; LSV, Landesschafzuchtverbände.

In Abhängigkeit vom Zuchtverband und der Rasse wurden – ohne dass dies gesetzlich gefordert war – etwa ab 2003/2004 nur noch Zuchttiere auf den Auktionen zugelassen, die mindestens einen ARR-Haplotypen trugen. In Bayern waren beispielsweise 2003 und 2004 nur Merinolandschaf-Böcke der NSP- bzw. G-Klassen 1 bis 3 und von 2005 bis 2008 nur der G-Klassen 1 und 2 zugelassen (Abb. 8). Die durchschnittlichen Verkaufspreise von Auktionsböcken der Rasse Merinolandschaf in Bayern zeigen beispielhaft, dass vor allem zu Beginn der TSE-Resistenzucht (2003 und 2004) Böcke mit dem Genotyp ARR/ARR (G1) deutlich höhere Preise erzielten als die der anderen G-Klassen (von 2005 bis 2008 nur G2). Seit der Wiederzulassung von Böcken der G-Klasse 3 (Abb. 9) im Jahr 2009 ist kein bedeutender Preisunterschied zwischen den G-Klassen bei den bayerischen Merinolandschaf-Auktionsböcken mehr festzustellen, 2010 zeigt sich sogar ein höherer durchschnittlicher Verkaufspreis von Böcken der G-Klasse 3 im Vergleich zu 1 und 2 (Abb. 9). Auch in Hessen wurden im Jahr 2010 wieder Merinolandschaf-Zuchtböcke der G-Klasse 3 gehandelt. In Thüringen dagegen trugen zwar im Jahr 2005 noch ca. 5 % aller über den Landesverband verkauften

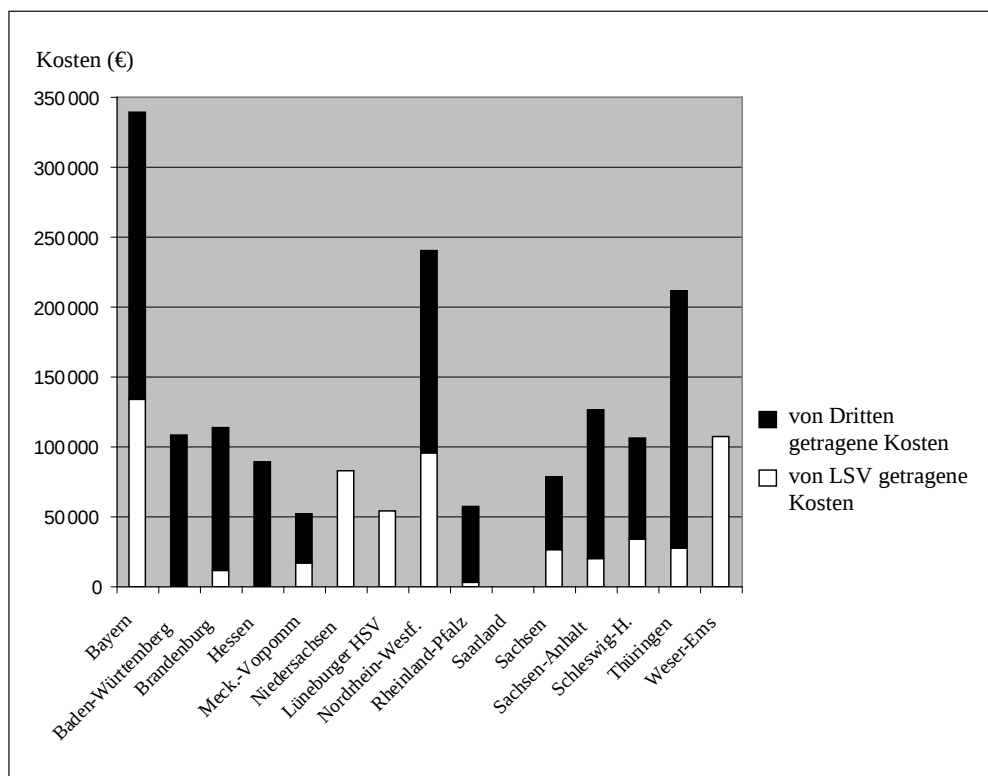


Abb. 7 Gesamtkosten (in Euro) für die *PRNP*-Genotypisierung von Zuchtschafen in den einzelnen Landesschafzuchtverbänden (LSV) von 2001–2006 (H.-J. RÖSLER, persönliche Mitteilung). Dritte: vor allem Tierseuchenkassen, z. T. auch Träger von Forschungsprojekten, Ministerien, Tierhalter unabhängig vom Zuchtverband.

Böcke *PRNP*-Genotypen der G-Klasse 3, jedoch werden seit 2006 ausschließlich Böcke der G-Klassen 1 und 2 auf den Auktionen gehandelt (U. MOOG, persönliche Mitteilung). Das Vereinigte Königreich beendete sein *ram genotyping scheme* zum Dezember 2008.

Wirtschaftlich gesehen sind dieses „Auf und Ab“ und das uneinheitliche Vorgehen in den verschiedenen Landesschafzuchtverbänden bei der TSE-Resistenzucht schwierig zu bewerten. Höhere Verkaufspreise der Böcke sind vorteilhaft für den Verkäufer, aber unvorteilhaft für den Käufer, insbesondere dann, wenn sich die tierseuchenrechtliche und damit auch züchterische Bedeutung der Selektion auf den Genotyp *ARR/ARR* verringert. So wirkt sich eine hohe *ARR*-Frequenz in der Herde seit Mitte 2007 nur noch im Fall der in Deutschland seltenen klassischen Scrapie positiv auf die durch die tierseuchenrechtlichen Maßnahmen entstehenden Kosten aus. Der derzeit zu beobachtende Rückzug einiger Schafzuchtverbände von der Selektion auf *ARR/ARR* scheint allerdings nur die Rassen zu betreffen, bei denen die Selektion auf diesen Genotyp aufgrund der relativ niedrigen Ausgangsfrequenz im Vergleich zu anderen Rassen schwieriger und noch nicht so weit vorangeschritten war, wie beispielsweise beim Merinolandschaf. Im Vergleich zu den Merinorassen wurde innerhalb der letzten Dekade beispielsweise bei den Fleischschafassen Suffolk und Schwarzköpfiges Fleischschaf eine deutlich höhere *ARR/ARR*-Genotypfrequenz erreicht, wie an Daten aus Thüringen zu

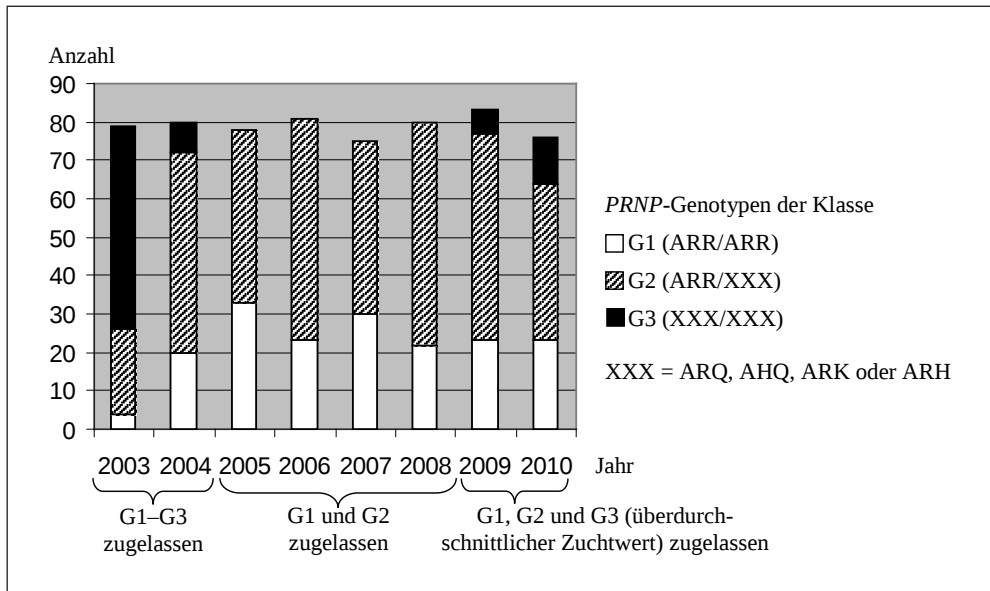


Abb. 8 Anzahl der aufgetriebenen Merinolandschaf-Auktionsböcke nach Genotyp (G)-Klassen in Bayern von 2003–2010 (C. MENDEL, persönliche Mitteilung)

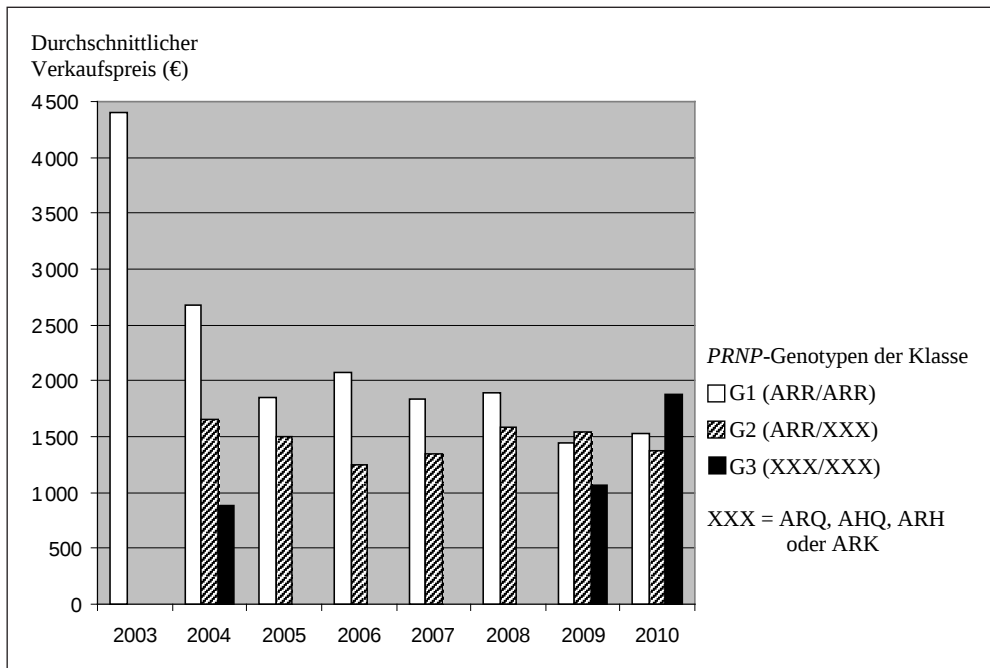


Abb. 9 Durchschnittlicher Verkaufspreis von Merinolandschaf-Auktionsböcken nach Genotyp (G)-Klassen in Bayern von 2003–2010 (C. MENDEL, persönliche Mitteilung)

erkennen ist (Abb. 10). Negative Auswirkungen auf Produktionsmerkmale wie Zunahme, Bemuskelung, Verfettung und Nährstoffverwertung, die im Endeffekt auch ökonomisch zu Buche schlagen würden, zeigen sich bisher durch die Selektion auf ARR/ARR nicht, wie eine Aufstellung der mittleren Zuchtwerte von Böcken der Rasse Merinolangwollschaf der Jahrgänge von 1995 bis 2004 in Thüringen beispielhaft zeigt (Tab. 5). In wissenschaftlichen Untersuchungen konnten ebenfalls für verschiedene ökonomisch wichtige Merkmale bei verschiedenen Schafrassen bisher keine Auswirkungen der Selektion auf ARR/ARR beobachtet werden (BRANDT et al. 2004, DE VRIES et al. 2004, 2005, LIPSKY et al. 2008, SWEENEY und HANRAHAN 2008). Auch eine direkt auf das Chromosom 13, auf dem das ovine *PRNP* genetisch kartiert wurde (LÜHKEN et al. 2006), bezogene Studie konnte keine Effekte dieses Chromosomenbereiches auf Milchleistungsmerkmale beim Schaf nachweisen (BARILLET et al. 2005). Allerdings wurden bei zwei ursprünglichen britischen Schafrassen Zusammenhänge zwischen *PRNP*-Genotypen und der Fellfarbe (SAWALHA et al. 2009) und bei der Rasse Scottish Blackface mit der Mobilisierung von Fettgewebe bei Mutterschafen und der postnatalen Überlebensrate von Lämmern beschrieben (SAWALHA et al. 2007, 2008).

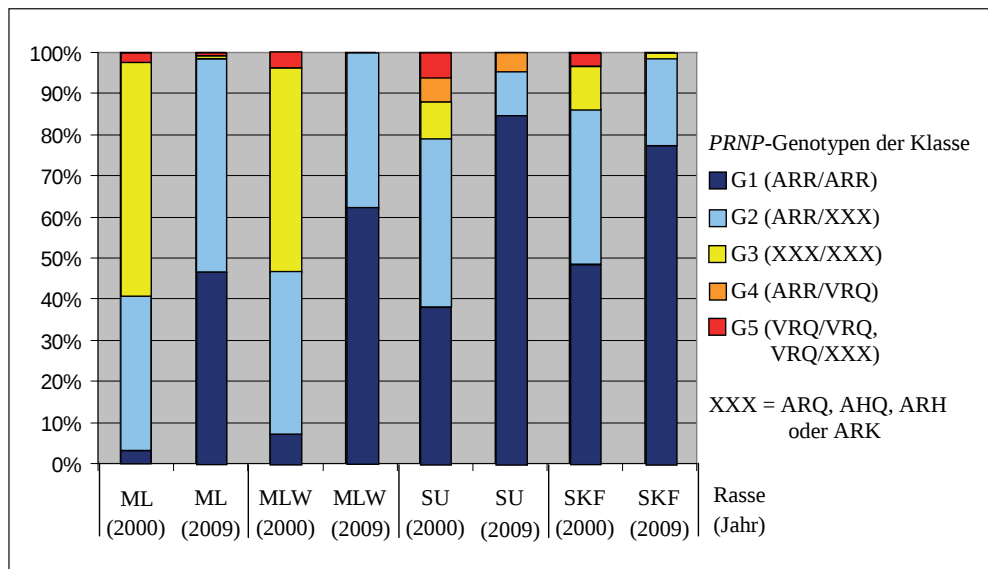


Abb. 10 Verteilung (%) der *PRNP*-Genotypen in Genotyp (G)-Klassen bei Zuchtbockanwärttern von Merinolandschaf (ML), Merinolangwollschaf (MLW), Suffolk (SU) und Schwarzköpfigem Fleischschaf (SKF) in Thüringen in 2000 und 2009 (U. Moog, persönliche Mitteilung)

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass für eine vollständige Bewertung der Anwendung der *PRNP*-Genotypisierung vielfältige weitere Aspekte wie beispielsweise die durch die Entsorgung gekeulter Schafe entstehenden Kosten und Auswirkungen des tierseuchenrechtlichen Vorgehens auf die berufliche Zukunft der Tierhalter und auf das Verbraucherverhalten berücksichtigt werden müssten.

Die sowohl aus der *PRNP*-Genotypisierung in von Scrapie betroffenen Schafherden als auch von Zuchttieren resultierende erhöhte Nachfrage nach der Gewinnung und moleku-

Tab. 5 Entwicklung der mittleren Zuchtwerte von Böcken der Rasse Merinolangwollschaf in Thüringen von 1995 bis 2004 (U. Moog, persönliche Mitteilung)

Jahrgang	Zunahme	Bemuskelung	Verfettung	Nährstoffverwertung
1995	105	100	102	100
1996	106	102	101	100
1997	102	99	99	100
1998	103	102	100	100
1999	104	97	102	100
2000	106	99	102	102
2001	107	103	103	101
2002	105	102	100	102
2003	105	101	102	100
2004	110	104	104	104

largenetischen Analyse von Schafblut- oder Gewebeproben führte sowohl in Deutschland als auch in anderen EU-Ländern zu Neugründungen und Wachstum von entsprechenden Biotechnikfirmen; allerdings wurden auch wirtschaftliche Verluste bis zum Konkurs durch Dumpingpreise, Fehlkalkulation von Probenaufkommen und Schadensersatzklagen nach Fehltypisierungen vermeldet. Erfolgreich waren vor allem Firmen, die im Zusammenhang mit der *PRNP*-Genotypisierung – zumindest noch für die wissenschaftlich eher unterrepräsentierte Tierart Schaf neue – Techniken und Methoden entwickelten oder einführten, wie beispielsweise die Entnahme von Gewebeproben mittels Ohrmarken oder sichere und effiziente Hochdurchsatz-Methoden zur Gewinnung von DNA aus Proben vom Schaf und zur Genotypisierung aller bedeutsamen *PRNP*-Allele. Während in Deutschland anfänglich rund zehn Anbieter für die kommerzielle *PRNP*-Genotypisierung von Schafproben konkurrierten, von denen noch deutlich weniger am Markt sind, erreichte beispielsweise im Vereinigten Königreich eine Biotechnikfirma durch Beauftragung mit der Genotypisierung für das nationale Zuchtprogramm seitens der Behörde einen monopol-ähnlichen Status und damit entsprechend hohe Umsätze.

Nicht zuletzt konnten in den zurückliegenden Jahren sowohl deutsche Forschungsinstitute als auch solche in anderen EU-Ländern über die Gewährung von Drittmitteln (nationale und EU-Gelder) zur Erforschung der genetisch bedingten TSE-Resistenz und den damit verbundenen Fragestellungen, wie der Auswirkung der Selektion auf andere Produktionsmerkmale und der Diversität der Schafrassen von der *PRNP*-Genotypisierung beim Schaf, profitieren.

3. Schlussfolgerungen

Die ökonomischen Konsequenzen der Anwendung oder Unterlassung der *PRNP*-Genotypisierung und -Selektion beim Schaf sind vom Zeitpunkt der Anwendung und der Situation des Anwenders bzw. Nutznießers abhängig.

Von 2002 bis Mitte 2007 wirkte sich die Anwendung der Genotypisierung in von Scrapie betroffenen Schaferden ab einem Anteil von etwa 10% aufgrund des Genotypisierungsergebnisses nicht zu keulender Schafe ökonomisch positiv für die Tierbesitzer und die Tierseuchenkassen aus. Durch die Anwendung der Aufschieberegelung konnte die *PRNP*-Geno-

typisierung auch in Herden mit niedriger ARR-Frequenz zur Reduzierung von Kosten führen. Nach Eröffnung der Möglichkeit, in atypisch Scrapie-positiven Schafherden sowohl auf eine Herdenkeulung als auch auf die *PRNP*-Genotypisierung und -Selektion zu verzichten (EU-Verordnung 727/2007) wird in solchen Herden keine *PRNP*-Genotypisierung und -Selektion mehr durchgeführt und ist auch ökonomisch nicht mehr sinnvoll.

In der Herdbuchschafzucht konnten mit Beginn der Scrapie-Resistenzucht Zuchttiere einiger Rassen, die den *PRNP*-Haplotypen ARR trugen, deutlich teurer verkauft werden bzw. waren für einige Jahre nur Zuchttiere mit solchen *PRNP*-Genotypen überhaupt zu den Auktionen zugelassen. Züchter, die in diesen Jahren gute Zuchttiere mit den entsprechenden Genotypen anbieten konnten, zogen aus dieser Situation einen ökonomischen Vorteil. Auf der anderen Seite mussten Züchter in dieser Zeit auch mehr Geld für Zuchttiere mit den entsprechenden Genotypen ausgeben. Für die Genotypisierung von Zuchttieren wurden von den Landesschafzuchtverbänden unterschiedlich hohe Anteile selbst finanziert; insgesamt gesehen wurde die Genotypisierung allerdings zum größeren Teil von den Tierseuchenkassen getragen. Der Anreiz für die Beteiligung der Tierseuchenkassen an der Genotypisierung von Zuchttieren und auch das Ziel der Schafzucht war das mittel- oder langfristige Erreichen von Scrapie-freien Schafherden oder wenigstens von Populationen mit einer hohen ARR-Frequenz, um Keulungsmaßnahmen in betroffenen Herden gar nicht oder in geringerem Umfang notwendig werden zu lassen. Auch wenn dies derzeit durch die Änderungen der gesetzlichen Vorgaben nur noch für die in Deutschland selten auftretende klassische Scrapie relevant ist, muss zumindest für die Rassen, bei denen es jetzt möglicherweise durch einen Rückzug einiger Zuchtverbände von der Selektion auf ARR nicht zu einer weiteren Erhöhung oder gar wieder zu einem Absinken der Frequenz dieses *PRNP*-Haplotypen kommt, der bisherige finanzielle Input der Zuchtverbände und der Tierseuchenkassen für die Genotypisierung als Verlust angesehen werden.

Abgesehen von individuellen finanziellen Problemen, bis hin zu Konkursen, hat die Biotechnikbranche sicherlich mehrheitlich durch Neugründungen und Wachstum von der *PRNP*-Genotypisierung beim Schaf profitiert.

Durch die nationale und internationale Förderung der TSE-Forschung konnten Drittmittel-Projekte zur *PRNP*-Genetik und Scrapie beim Schaf realisiert werden, d. h. für eine Tierart, für die im Vergleich mit anderen Spezies Drittmittel oftmals schwierig zu erlangen sind.

Dank

Die Autoren danken Dr. C. MENDEL, Dr. U. MOOG und Dr. H.-J. RÖSLER für die Bereitstellung von Informationen und Daten.

Literatur

- Anonymus*: Proceedings of the House of Commons. (1755)
- BARILLET, F., ARRANZ, J. J., and CARTA, A.: Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep. *Genet. Sel. Evol.* 37(Suppl. 1), 109–123 (2005)
- BELT, P. B., MUILEMAN, I. H., SCHREUDER, B. E., BOS-DE RUIJTER, J., GIELKENS, A. L., and SMITS, M. A.: Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 76, 509–517 (1995)
- BENESTAD, S. L., SARRADIN, P., THU, B., SCHÖNHEIT, J., TRANULIS, M. A., and BRATBERG, B.: Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* 153, 202–208 (2003)

- BRANDT, H., LÜHKEN, G., LIPSKY, S., und ERHARDT, G.: Der Einfluss von Polymorphismen im Prionprotein-Gen bei Merinoland- und Rhönschafen auf Fruchtbarkeitsmerkmale bei Mutterschafen und Gewichte bei Lämmern. *Züchtungskunde* 76, 344–353 (2004)
- BRUCE, M. E., WILL, R. G., IRONSIDE, J. W., MCCONNELL, I., DRUMMOND, D., SUTTIE, A., MCCARDLE, L., CHREE, A., HOPE, J., BIRKETT, C., COUSENS, S., FRASER, H., and BOSTOCK, C. J.: Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 498–501 (1997)
- BUSCHMANN, A., BIACABE, A. G., ZIEGLER, U., BENCSIK, A., MADEC, J. Y., ERHARDT, G., LÜHKEN, G., BARON, T., and GROSCHUP, M. H.: Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Methods* 117, 27–36 (2004)
- BUSCHMANN, A., and GROSCHUP, M. H.: TSE eradication in small ruminants-quo vadis? *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 118, 365–371 (2005)
- CONCEPCION, G. P., DAVID, M. P., and PADLAN, E. A.: Why don't humans get scrapie from eating sheep? A possible explanation based on secondary structure predictions. *Med. Hypotheses* 64, 919–924 (2005)
- COSSEDDU, G. M., AGRIMI, U., PINTO, J., and SCHUDEL, A. A.: Advances in scrapie research. *Rev. Off. Int. Epizoot.* 26, 657–668 (2007)
- DAWSON, M., HOINVILLE, L. J., HOSIE, B. D., and HUNTER, N.: Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Scrapie Information Group. Vet. Rec.* 142, 623–625 (1998)
- DETWILER, L.: Portrait der Traberkrankheit bei Schaf und Ziege (Scrapie). In: HÖRNLIMANN, B., RIESNER, D., und KRETZSCHMAR, H. (Eds.): *Prionen und Prionenerkrankungen*. S. 165–172. Berlin: de Gruyter 2001
- EISEN, J. M., AMIGUES, Y., SCHELCHER, F., DUCROCQ, V., ANDREOLETTI, O., EYCHENNE, F., KHANG, J. V., POIVEY, J. P., LANTIER, F., and LAPLANCHE, J. L.: Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.* 144, 431–445 (1999)
- European Commission*: Report on the Monitoring and Testing of Ruminants for the Presence of Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) in the EU in 2003, including the Results of the Survey of Prion Protein Genotypes in Sheep Breeds. Brussels 2004
- European Commission*: Report on the Monitoring and Testing of Ruminants for the Presence of Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) in the EU in 2008. Brussels 2008
- GOLDMANN, W., HUNTER, N., SMITH, G., FOSTER, J., and HOPE, J.: PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J. Gen. Virol.* 75, 989–995 (1994)
- GRETZSCHEL, A., BUSCHMANN, A., EIDEN, M., ZIEGLER, U., LÜHKEN, G., ERHARDT, G., and GROSCHUP, M. H.: Strain typing of German transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 55–63 (2005)
- HUNTER, N., GOLDMANN, W., BENSON, G., FOSTER, J. D., and HOPE, J.: Swaledale sheep affected by natural scrapie differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of scrapie. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 6), 1025–1031 (1993)
- LE DUR, A., BERINGUE, V., ANDREOLETTI, O., REINE, F., LAI, T. L., BARON, T., BRATBERG, B., VILOTTE, J. L., SARRADIN, P., BENESTAD, S. L., and LAUDE, H.: A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 120/44, 16031–16036 (2005)
- LIPSKY, S., BRANDT, H., LÜHKEN, G., and ERHARDT, G.: Analysis of prion protein genotypes in relation to reproduction traits in local and cosmopolitan German sheep breeds. *Anim. Reprod. Sci.* 103, 69–77 (2008)
- LÜHKEN, G., BRANDT, H. R., BUSCHMANN, A., GROSCHUP, M. H., and ERHARDT, G.: Microsatellite CTSBJ12 is located distal to the ovine prion protein gene on OAR13 and is not associated with scrapie susceptibility. *Anim. Genet.* 37, 426–427 (2006)
- LÜHKEN, G., BUSCHMANN, A., BRANDT, H., EIDEN, M., GROSCHUP, M. H., and ERHARDT, G.: Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet. Res.* 38, 65–80 (2007)
- MADEC, J. Y., SIMON, S., LEZMI, S., BENCSIK, A., GRASSI, J., and BARON, T.: Abnormal prion protein in genetically resistant sheep from a scrapie-infected flock. *J. Gen. Virol.* 85, 3483–3486 (2004)
- MCGOWAN: Scrapie in sheep. *J. Agric.* 5, 365–375 (1922)
- ORGE, L., GALO, A., MACHADO, C., LIMA, C., OCHOA, C., SILVA, J., RAMOS, M., and SIMAS, J. P.: Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J. Gen. Virol.* 85, 3487–3491 (2004)
- PRUSINER, S. B.: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144 (1982)
- SAWALHA, R. M., BELL, L., BROTHERSTONE, S., WHITE, I., WILSON, A. J., and VILLANUEVA, B.: Scrapie-resistant sheep show certain coat colour characteristics. *Genet. Res.* 91, 39–46 (2009)
- SAWALHA, R. M., BROTHERSTONE, S., CONINGTON, J., and VILLANUEVA, B.: Lambs with scrapie susceptible genotypes have higher postnatal survival. *PLoS One* 2, e1236 (2007)
- SAWALHA, R. M., BROTHERSTONE, S., LAMBE, N. R., and VILLANUEVA, B.: Association of the prion protein gene with individual tissue weights in Scottish Blackface sheep. *J. Anim. Sci.* 86, 1737–1746 (2008)

- SWEENEY, T., and HANRAHAN, J. P.: The evidence of associations between prion protein genotype and production, reproduction, and health traits in sheep. *Vet. Res.* 39, 28 (2008)
- TOUMAZOS, P.: Scrapie in Cyprus. *Br. Vet. J.* 147, 147–154 (1991)
- VRIES, F. DE, BORCHERS, N., HAMANN, H., DRÖGEMÜLLER, C., REINECKE, S., LUPPING, W., and DISTL, O.: Associations between the prion protein genotype and performance traits of meat breeds of sheep. *Vet. Rec.* 155, 140–143 (2004)
- VRIES, F. DE, HAMANN, H., DRÖGEMÜLLER, C., GANTER, M., and DISTL, O.: Analysis of associations between the prion protein genotypes and production traits in East Friesian milk sheep. *J. Dairy Sci.* 88, 392–398 (2005)
- WILESMITH, J. W., WELLS, G. A., CRANWELL, M. P., and RYAN, J. B.: Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123, 638–644 (1988)
- YOKOYAMA, T., and MOHRI, S.: Prion diseases and emerging prion diseases. *Curr. Med. Chem.* 15, 912–916 (2008)

Dr. Gesine LÜHKEN
Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
Justus-Liebig-Universität Gießen
Ludwigstraße 21b
35390 Gießen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 641 9937672
Fax: +49 641 9937629
E-Mail: Gesine.Luhken@agrar.uni-giessen.de

Prof. Dr. Georg ERHARDT
Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
Justus-Liebig-Universität Gießen
Ludwigstraße 21b
35390 Gießen
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 641 9937620
Fax: +49 641 9937629
E-Mail: Georg.Erhardt@agrar.uni-giessen.de

V. Kurzfassungen der Vorträge und Posterzusammenfassungen

HTP-Sequenzierung von Genomen¹

Ruedi FRIES², Sebastian ECK³ und Tim M. STROM³

Sequenziergeräte der zweiten und dritten Generation ermöglichen die Sequenzierung von Genomen im Hochdurchsatz (*high throughput*, HTP). Breit eingesetzt werden zurzeit Geräte der zweiten Generation, mit denen routinemäßig 30 Milliarden Basen in etwa 10 Tagen gelesen werden können. Die Leselängen betragen 50 bis 100 Basen. Es wird erwartet, dass der Durchsatz der Geräte der zweiten Generation in der nächsten Zeit noch um das bis zu Zehnfache gesteigert werden kann. Die Kosten für eine mindestens 30-fache Abdeckung eines Säugeriergenoms werden dann 6000–10 000 Euro betragen. Weitere Veränderungen sind durch die Verfügbarkeit von Geräten der dritten Generation zu erwarten, welche die Sequenzierung auf der Basis von einzelnen DNA-Molekülen bei Leselängen bis zu 10 000 Basen ermöglichen. Vieles spricht dafür, dass in der Folge der Markteinführung dieser Geräte das 1000-Euro-Genom Realität werden wird.

Im Nutztierbereich wird die Hochdurchsatzsequenzierung der zweiten Generation zurzeit vor allem zur Identifizierung von Polymorphismen in der Form von Einzelbasenaustauschen (SNPs) als Grundlage für die Erstellung von hochdichten Genotypisierungschips eingesetzt. Es wird daran gearbeitet, über sogenannte *Paired-End*- und *Mate-Pair-Reads* die relativ kurzen Leselängen zu kompensieren und dadurch die Lücken der Referenzsequenzen zu schließen. Eine weitere Herausforderung ist die systematische Identifizierung von strukturellen Varianten, die vor allem in der Form einer variablen Zahl von Genkopien einen beträchtlichen Teil der bis jetzt nicht erklärbaren genetischen Variation ausmachen könnten. Schließlich wird auch abgeklärt, wie über die Sequenzierung von ausgewählten Schlüsseltieren und die Genotypisierung aller Kandidatentiere die individuelle Sequenz jedes Tieres durch *Imputing* ermittelt und dadurch die Zuverlässigkeit der genomischen Vorhersage der Zuchtwerte verbessert werden könnte. Mit diesen Arbeiten sollen die routinemäßige Verwendung von individuellen Sequenzen in der Tierzucht vorbereitet werden. Abschließend soll betont werden, dass die konsequente Nutzung der neuen Sequenzierungstechnologien in der

1 Die vorgestellten Arbeiten werden vom Deutschen Ministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des AgroClustEr „Synbreed – Synergistische Pflanzen- und Tierzüchtung“ und von der Dr. Dr. h. c. Karl Eibl-Stiftung gefördert.

2 Lehrstuhl für Tierzucht, Technische Universität München.

3 Institut für Humangenetik, Helmholtz Zentrum München.

Tierzucht nur dann gewährleistet sein wird, wenn es gelingen wird, mit den enormen Datenmengen effizient umzugehen.

Prof. Dr. Ruedi FRIES
Lehrstuhl für Tierzucht
Technische Universität München
Liesel-Beckmann-Straße (Hochfeldweg) 1
85376 Freising-Weihenstephan
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 8161 713228
Fax: +49 8161 713107
E-Mail: Ruedi.Fries@tierzucht.tum.de

Zukünftige Entwicklungen bei der Genomsequenzierung

Christian SCHLÖTTERER (Wien, Österreich)

Die zweite Generation der Sequenziergeräte (Illumina, 454-Roche, SOLiD) hat eine Revolution in der Genomsequenzierung eingeleitet: Projekte, die bis dahin nur in großen Sequenzierzentren durchgeführt werden konnten, sind jetzt selbst in kleinen Labors durchführbar. Bisher hat sich das Hauptaugenmerk auf sogenannte „Resequenzierungsprojekte“ gerichtet. Schon jetzt ist es möglich für ca. 10 000 Euro ein menschliches Genom zu sequenzieren. Mit der dritten Generation der Sequenziergeräte wird nochmals ein neuer Qualitätssprung erreicht werden. Durch das Sequenzieren einzelner Moleküle wird die Analyse struktureller Varianten deutlich vereinfacht werden.

Mein Vortrag wird sich jedoch auf die vielfältigen Möglichkeiten der Sequenziergeräte der zweiten Generation konzentrieren und ausloten, wie kostengünstige Populationsanalysen durchgeführt werden können.

Prof. Dr. Christian SCHLÖTTERER
Institut für Populationsgenetik
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
1210 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 250774300
Fax: +43 1 250774390
E-Mail: christian.schloetterer@vetmeduni.ac.at

Human Rights and Science

Leopoldina-Symposium

Vom 6. bis 7. Oktober 2010 in Berlin

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 113, Nr. 387

Herausgegeben von Johannes ECKERT (Zürich) und Hans-Peter ZENNER (Tübingen)
(2011, 96 Seiten, 3 Abbildungen, 20,50 Euro, ISBN: 978-3-8047-2941-4)

Viele Organisationen und Institutionen beschäftigen sich mit den Menschenrechten, zu denen das Recht auf Entwicklung, auf eine saubere und gesunde Umwelt sowie Frieden gehören. Gerade für Wissenschaftler und ihre Institutionen ist die Freiheit von Lehre und Forschung ein hohes Gut. Der Band berichtet über ein Symposium, organisiert vom *Human Rights Committee* (HRC) der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften, das dem wichtigen und aktuellen Thema *Menschenrechte und Wissenschaft* gewidmet war. Es vereinte Repräsentanten von Akademien und Universitäten aus 12 europäischen Ländern. In den Beiträgen wird die Bedeutung der Menschenrechte u. a. in der Gesetzgebung, im alltäglichen Wissenschaftsbetrieb, in der Forschung am Menschen sowie in der internationalen Kooperation in Wissenschaft und Entwicklungshilfe aufgezeigt. Die akademische Gemeinschaft sollte nicht nur Menschenrechtsverletzungen anklagen, sondern Menschenrechtsaspekte auch in nationalen und internationalen Forschungsprojekten beachten. Um die Bedürfnisse von bedrohten und marginalisierten Bevölkerungsgruppen zu berücksichtigen, ist eine Neuausrichtung der Forschung erforderlich. Die Beiträge berichten über die Menschenrechtssituation in verschiedenen Ländern und die vom *International Human Rights Network of Academies and Scholarly Societies* (IHRN) koordinierten weltweiten Aktionen zugunsten von Personen aus dem akademischen Bereich, die Menschenrechtsverletzungen ausgesetzt sind. Große Besorgnisse werden über Verletzungen der Menschenrechte in verschiedenen Teilen der Welt, inklusive Europa, geäußert, vor allem auch über Folter, die noch in vielen Ländern praktiziert wird. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

Genetische Varianten und Merkmalsausprägung

Ottmar DISTL (Hannover)

Die möglichst umfassende Beschreibung der Beziehung zwischen Varianten und der Merkmalsausprägung ist eine wesentliche Voraussetzung, um genetische Mechanismen zu verstehen. Diese Modelle beinhalten in der einfachsten Darstellung die Ausprägung des Phänotyps als abhängige Variable und die Genwirkungen einer beliebigen Anzahl von Genloci mit ihren additiven und dominanten Wirkungen als erklärende Faktoren. Epistatische Genwirkungen sprengen sehr schnell den Rahmen des Modells und über Zwei-Locus-Modelle hinausgehende Parameterisierungen werden sehr komplex. Weitere Variationsursachen sind Gen-Umwelt-Interaktionen, epistatische und mitochondriale Effekte, Stratifikationseffekte infolge ungleicher Verteilung der Nachkommen der Zuchttiere in den verschiedenen Generationen sowie genetischer Heterogenität der untersuchten Population oder Kreuzungspopulation, Inzucht- und Heterosiseffekte. Die nicht erklärbaren Variationsursachen bilden die unbekannten und zufällig verteilten Resteffekte. Mit der Sequenzierung von kompletten Genomen von Haustieren können zunehmend Merkmale mit einer einfachen genetischen Architektur molekular-genetisch aufgeklärt und deren Wirkungsmechanismen beschrieben werden. Dadurch wird es möglich, eine variable Expression bei monogenen Merkmalen aufzuklären und mögliche Effekte weiterer Gene und/oder Mutationen auf die Expression zu untersuchen. Auch monogenische Merkmale, die erst später im Leben auftreten, können entweder über ihre Genese und/oder weitere modulierende Gene erklärt werden. Komplexe Merkmale sind nach wie vor in ihrer Gesamtheit schwierig zu erfassen, da eine Vielzahl von Genwirkungen eine Rolle spielen, Geninteraktionen nur mit sehr großen Umfängen an Probanden analysiert werden können, Gen-Umwelt-Interaktionen sehr komplex sind und häufig nur unter experimentellen Bedingungen darstellbar sind. Für die Beschreibung von quantitativen phänotypischen Merkmalswerten werden demzufolge in den meisten Modellen die additiven und Dominanzwirkungen eines Locus verwendet. Für die simultane Berücksichtigung aller Loci wurden verschiedene Algorithmen entwickelt, insbesondere um die Überparameterisierung der Daten zu vermeiden. Die Schwierigkeit für komplexe Merkmale besteht darin, dass viele Mutationen eine Rolle für die Merkmalsausprägung spielen und es sehr schwierig ist, zwischen kausalen und im Kopplungsungleichgewicht stehenden Mutationen zu differenzieren. Die Sequenzierungen von einer größeren Anzahl von Einzelindividuen sowie die Rekonstruktion der Haplotypen werden hier sicherlich zu einem verbesserten Verständnis beitragen. Mit der genomischen Selektion ist es jetzt bereits möglich, komplexe Merkmale und hier insbesondere Gesundheitsmerkmale züchterisch zu verändern und einen signifikanten Zuchtfortschritt in-

nerhalb weniger Generationen ohne wesentliche Inzuchtzunahme zu erreichen. Die Zucht auf Gesundheit kann damit in der Tierzucht ihren herausragenden Stellenwert weiter verbessern.

Prof. Dr. Ottmar DISTL
Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 17p
30559 Hannover
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 511 9538875
Fax: 49 511 9538582
E-Mail: ottmar.distl@tiho-hannover.de

Methodik zur Analyse von SNPs auf Einzeltierbasis

Georg THALLER (Kiel)

Die rapiden Entwicklungen in der Detektierung von SNPs einerseits und deren kostengünstige Darstellung in automatisierten Hochdurchsatzverfahren auf der anderen Seite bieten eine vollkommen neuartige Ressource für die Erforschung der genetischen Architektur qualitativer und quantitativer Merkmale bei den Nutztierarten. Stellte bisher in den genomweiten Kartierungsstudien von QTL oder den Assoziationsstudien von Kandidatengenen meist die verfügbare Markerinformation den begrenzenden Faktor dar, so steht die statistische Genetik in den Nutztierwissenschaften nun vor der Herausforderung, adäquate Methoden zur Analyse und sinnvollen züchterischen Umsetzung der massiven SNP-Daten auf Einzeltierbasis zu entwickeln.

Mit Hilfe der SNPs können Fragestellungen sowohl der quantitativen Genetik als auch der Populationsgenetik direkt auf der Ebene des Genoms bearbeitet werden. Im Vordergrund stehen derzeit Verfahren, die eine möglichst präzise Beschreibung der genetischen Variation im Populationskontext und die züchterische Bewertung von Einzeltieren erlauben. Dies geschieht mit Hilfe von genomweiten Assoziationsstudien zum indirekten Nachweis kausaler Genvarianten über Kopplungsungleichgewichte zu den anonymen SNPs. Dabei können vergleichsweise einfache varianzanalytische Auswertungen verwendet werden, wobei allerdings Stratifizierungen der Population und die Problematik des multiplen Testens zu berücksichtigen sind. Alternativ dazu können phänotypisch extrem unterschiedliche Tiergruppen auf Allelfrequenzunterschiede der SNP-Allele getestet werden. Am intensivsten wird derzeit die ‚Genomische Selektion‘ bzw. genomische Zuchtwertschätzung beforscht. Das Ziel ist hierbei weniger die Aufklärung der genetischen Hintergründe, sondern vielmehr die summarische Abbildung von aggregierten Phänotypen einer sogenannten Lernstichprobe auf die Gesamtheit oder Subsets der SNPs. Diese SNP-Schätzwerte ermöglichen im Folgenden die Vorhersage des Zuchtwertes von Tieren, die selbst weder eigene noch Nachkommenleistungen aufweisen. Dazu wurde eine Reihe von statistischen Verfahren vorgeschlagen, die teilweise auf der Variablenselektion, auf Effektschätzung mit Hilfe von Bayes-Verfahren oder auf der Nutzung der genomischen Verwandtschaftsmatrix in der klassischen quantitativ-genetischen BLUP-Methodik beruhen. Dieses innovative Schätzverfahren steht kurz vor der Einführung in die praktische Zuchtarbeit. Noch zu klärende Fragestellungen sind u. a. die Bestimmung der Sicherheit der Zuchtwertschätzung, die Bedeutung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen der Lern- und der zu schätzenden Population sowie die Belastbarkeit der SNP-Schätzer über die Generationen hinweg.

Genomweite SNP-Information kann im Weiteren für die genomische Charakterisierung von Populationen genutzt werden. Die feingliedrige Untersuchung der Haplotypenstruktur liefert über den Nachweis überdurchschnittlich homozygoter oder heterozygoter Regionen Hinweise auf kurz- oder langfristig wirksame selektive Kräfte oder Adaptationsmechanismen. Genomische Vergleiche zwischen z. B. Fleisch- und Milchrassen beim Rind können zur Aufdeckung chromosomaler Bereiche führen, welche ursächlich für die unterschiedlichen Nutzungsrichtungen verantwortlich sind.

Prof. Dr. Georg THALLER
Institut für Tierzucht und Tierhaltung der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Hermann-Rodewald-Straße 6
24098 Kiel
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 431 8807329
Fax: +49 431 8802288
E-Mail: gthaller@tierzucht.uni-kiel.de

Genomische Selektion – Entwicklung und Implementierung

Johann SÖLKNER¹, Birgit GREDLER¹, Martin MAYERHOFER², Johann TANZLER³
und Christa EGGER-DANNER²

Genomische Selektion (MEUWISSEN et al. 2001) nutzt die Information einer großen Anzahl von über das Genom verteilten Markern zur Schätzung des genetischen Potentials („Zuchtwerte“) von Tieren, ohne explizit nach Genen mit großer Wirkung (QTL) zu suchen und deren Funktion aufklären zu wollen. Erste Ergebnisse in der Rinderzucht bei der Rasse Holstein Friesian (z. B. SÖLKNER et al. 2007, VAN RADEN 2008) waren sehr viel versprechend. SCHAEFFER (2006) berechnete in Simulationen eine Verdopplung des Zuchtfortschritts durch Halbierung des Generationsintervalls bei Verzicht auf die bislang übliche Nachkommenprüfung. Die österreichische Fleckviehzucht entschloss sich 2007, gemeinsam mit BOKU und ZuchtData ein Projekt zur genomischen Selektion bei Fleckvieh zu starten. In einem von der Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft GmbH (FFG) geförderten Projekt wurden ~2000 Nachkommen-geprüfte Fleckviehtiere mit dem Illumina Bovine SNP50™-Beadchip für jeweils 54001 SNP-Marker genotypisiert.

Verschiedene statistische Ansätze werden aktuell verfolgt, um SNP-Informationen in Schätzformeln für Zuchtwerte verschiedenster Merkmale einzubeziehen. Ein Ansatz verwendet Sets von hoch informativen SNPs, ein anderer multivariater Ansatz extrahiert Hauptkomponenten aus der Information aller SNP, und eine dritte Methode ersetzt lediglich die bislang in der Zuchtwertschätzung übliche Pedigree-Verwandtschaft durch einen Schätzer der genomischen Ähnlichkeit von Tieren. Unsere Ergebnisse bei Fleckvieh und Studien bei anderen Rassen zeigen, dass die resultierenden Schätzer trotz der konzeptionellen Verschiedenheit der Ansätze sehr ähnlich sind. Die derzeit vorliegenden Ergebnisse bei Fleckvieh sind niedriger als jene bei Holstein Friesian. Mögliche Ursachen sind ein geringerer Genotypenpool sowie eine größere effektive Populationsgröße und das daraus resultierende geringere Kopplungsungleichgewicht benachbarter Marker. Aktuell wird ein Genotypenpool österreichischer und deutscher Stiere geschaffen, weil die Sicherheit der Schätzer mit einer größeren Lernstichprobe nachhaltig verbessert werden kann. Es ist zu erwarten, dass der neue Illumina-SNP-Chip mit über 700 000 SNP bei zukünftigen Genotypisierungen den aktuellen Chip ablösen wird. Die Routine der Schätzung genomischer Zuchtwerte bei Fleckvieh ist in etwa einem Jahr zu erwarten.

1 Universität für Bodenkultur Wien, Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 Wien.

2 ZuchtData EDV-Dienstleistungen GmbH, Dresdner Straße 89/19, A-1200 Wien.

3 Arbeitsgemeinschaft österreichischer Fleckviehzüchter, Pater-Werner-Deibl-Straße 4, A-3910 Zwettl.

Literatur

- MEUWISSEN, T. H. E., HAYES, B. J., and GODDARD, M. E.: Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819–1829 (2001)
- SCHAEFFER, L. R.: Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 123, 218–223 (2006)
- SÖLKNER, J., TIER, B., CRUMP, R., MOSER, G., and RAADSMA, H.: A formal comparison of different methods of utilizing SNP information of molecular breeding values in whole genome selection. Dublin: 58th Annual Meeting of the European Association of Animal Production, 25.–29.8. 2007 (2007)
- VAN RADEN, P.: Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 91, 4414–4423 (2008)

Prof. Dipl.-Ing. Dr. Johann SÖLKNER
Universität für Bodenkultur Wien
Institut für Nutztierwissenschaften
Gregor-Mendel-Straße 33
A-1180 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 476543271
E-Mail: johann.soelkner@boku.ac.at

„Hitchhiking Mapping“ – ein neuer Ansatz zur Kartierung von QTLs in Rinderpopulationen

Hermann SCHWARZENBACHER^{1,2}, Marlies DOLEZAL^{2,3},
Christian SCHLÖTTERER³ und Ruedi FRIES¹

Die meisten ökonomisch wichtigen Merkmale beim Rind werden von einer unbekannten Anzahl an Genen und von der Umwelt beeinflusst. Ohne detailliertes Wissen über die zugrunde liegende genetische Architektur der Merkmale war der Zuchtfortschritt für Milchleistungsmerkmale vergangener Jahrzehnte beim Rind dennoch enorm. Die konsequente Auswahl von hervorragenden Vererbern aufgrund geschätzter Zuchtwerte, basierend auf Pedigree- und Leistungsinformation, kann jedoch durch molekulargenetische Information verbessert werden.

Kopplungsanalysen haben erfolgreich genomische Regionen mit signifikantem Einfluss auf ökonomisch wichtige Merkmale identifiziert. Eine ungenügende Anzahl an beobachteten Rekombinationen behindert jedoch die Identifizierung von potentiellen Kandidatengenen. In jüngster Zeit erlauben dicht über das Genom gestreute Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP)-Marker diese quantitative Methode auf Populationsebene auszuweiten.

Ein alternativer populationsgenetischer Ansatz zur Kartierung intraspezifischer Variation von komplexen Merkmalen ist das sogenannte „Hitchhiking Mapping“. Die Populationsgenetik erlaubt die Vorhersage, dass positiv selektierte Genvarianten entweder verloren gehen oder stark in ihrer Frequenz ansteigen, bis alle Individuen einer Population die positive Variante tragen. Dabei werden auch benachbarte Regionen, die nicht durch Rekombinationen von der kausalen Mutation entkoppelt werden, mitselektiert. Dies hinterlässt typische Signaturen im Genom, die wir anhand einer Stichprobe von 287 deutschen Brown Swiss-Stieren sichtbar gemacht haben. Rund 2000 der 54 001 in jedem Tier genotypisierten SNPs zeigen Selektions-signaturen. Ähnliche Signaturen werden jedoch auch durch demographische Ereignisse, wie eine Reduktion der Populationsgröße im Zusammenhang mit Domestikation und Rassenbe-gründung, hinterlassen. Populationsgenetik allein kann diese falsch positiven Signale nicht von echten unterscheiden.

Die Teststärke genomweiter Assoziationsstudien, als quantitativ genetische Methode, auf der anderen Seite ist stark von der Anzahl genotypisierter Tiere abhängig. Unser Datensatz hat ausreichend Teststärke, um Genorte aufzufinden, die mindestens 10 % der Varianz erklä-

1 Lehrstuhl für Tierzucht, Technische Universität München, Hochfeldweg 1, 85376 Freising-Weihenstephan, Bundesrepublik Deutschland.

2 Beide Autoren haben gleich viel zu dieser Studie beigetragen.

3 Institut für Populationsgenetik, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Österreich.

ren. Die Kombination dieser beiden komplementären Ansätze erhöht jedoch die Teststärke, Genorte unter Selektion mit signifikantem Einfluss auf ökonomisch wichtige Merkmale zu identifizieren, bei gleichzeitiger Reduktion der falsch positiven Signale.

Dr. Hermann SCHWARZENBACHER
ZuchtData EDV Dienstleistungen GmbH
Dresdner Straße 89/19
1200 Wien
Österreich
Tel.: +43 1 3341733
Fax: +43 1 3341713
E-Mail: schwarzenbacher@zuchtdata.at

***PITX3*-Mutation verursacht die vererbte Mikrophthalmie beim Texelschaf**

Doreen BECKER und Cord DRÖGEMÜLLER (Bern, Schweiz)

Die Mikrophthalmie beim Texelschaf ist eine autosomal monogen rezessiv vererbte, kongenitale Missbildung beider Augen. In verschiedenen europäischen Zuchtgebieten wurden seit der Einkreuzung von Texelschafen aus den Niederlanden immer wieder vollständig blinde Lämmer mit bilateraler Kleinäugigkeit (Mikrophthalmie) ohne weitere Missbildungen geboren. Eine deskriptive Studie zur Pathogenese der Mikrophthalmie beim Texelschaf zeigte eine frühembryonale sekundäre Linsenentwicklungsstörung. Das Ziel dieser Studie war die molekulare Aufklärung der kausalen Mutation für die vererbte Mikrophthalmie beim Texelschaf und die anschließende Entwicklung eines Gentests für die Schafzucht. Dazu wurde erstmalig der ovine 50kSNP-Chip zur positionellen Klonierung eingesetzt. Durch genomweite Assoziations- und Homozygotiekartierung nach Genotypisierung von 49'034 SNP-Markern bei 23 betroffenen Lämmern und 23 gesunden Kontrolltieren konnte die Mutation für die Mikrophthalmie auf einem 2,4 Mb großen Intervall auf dem Schafchromosom 22 lokalisiert werden. In diesem Genomabschnitt befindet sich das *PITX3*-Gen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der die Linsenentwicklung beeinflusst. Die sehr ähnlichen Augenphänotypen der *aphakia*- und *eyeless*-Mausmutanten lassen sich ebenfalls auf Mutationen im *Pitx3*-Gen zurückführen. Daher wurde die genomische Sequenz des *PITX3*-Gens beim Schaf durch Sequenzierung eines BAC-Klons ermittelt. Eine Charakterisierung der ovinen *PITX3*-Transkripte erfolgte mit Hilfe embryonaler Gewebe vom Schaf. Die Mutationsanalyse zeigte, dass der Mikrophthalmie-Phänotyp mit einer Punktmutation im *PITX3*-Gen (c.338G>C) assoziiert ist. Der resultierende Aminosäureaustausch (p.R113P) betrifft eine hoch konservierte Position in der *PITX3*-Homeodomäne und führt zu einer stark veränderten Proteinstruktur. Über 130 betroffene Lämmer waren homozygot für das mutierte C-Allel. Somit konnte die potentiell ursächliche Mutation für die vererbte Mikrophthalmie beim Texelschaf identifiziert und ein direkter Gentest entwickelt werden. Die Genotypisierung einer Stichprobe unverwandter Texelschafe zeigte eine Frequenz von ca. 4,5 % Träger für die verantwortliche *PITX3*-Mutation.

Dr. Doreen BECKER
Prof. Dr. Cord DRÖGEMÜLLER
Institut für Genetik
Vetsuisse-Fakultät
Universität Bern
Bremgartenstrasse 109a
3001 Bern
Schweiz

Tel.: +41 31 6312524
Fax: +41 31 6312640
E-Mail: Doreen.Becker@vetsuisse.unibe.ch
Cord.Droegemueller@vetsuisse.unibe.ch

Bild und Bildlichkeit

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 113, Nr. 386

Herausgegeben von Otfried HÖFFE (Tübingen)

(2012, 112 Seiten, 13 Abbildungen, 20,50 Euro, ISBN: 978-3-8047-3027-4)

Der Band behandelt aus verschiedenen Perspektiven das Themenfeld „Bild – Metapher – Modell“. Er zeigt, auf wie vielfältige Weise Philosophen, Philologen, Kulturwissenschaftler und Rechtshistoriker die Bedeutung und Aussagekraft von Metaphern, Bildern und Modellen erschließen und verarbeiten. Dabei werden verschiedene Auffassungen zur Metapher aus der Geschichte der Philosophie behandelt und Beschreibungen der Metapher unter Rekurs auf das Phänomen der Konnotation versucht. Einen weiteren Schwerpunkt bilden Betrachtungen zur Langfristigkeit und Wirkung von Erinnerungen, die Untersuchung von Formen des kulturellen Gedächtnisses sowie die Analyse der Darstellungen des chinesischen Parteiführers Mao Zedong in verschiedenen Perioden der jüngeren chinesischen Geschichte, von der sogenannten Kulturrevolution bis in die Gegenwart. Darüber hinaus wird belegt, dass auch die Rechtsgeschichte sich reich an Bildern, bildhaften Ritualen und Symbolen erweist. Auch die Rechtssprache ist voller Metaphern, in denen verbildlicht, verkörpert und verräumlicht wird. Gleichwohl bleibt die Rechtsordnung eine kommunikative Ordnung von Texten. Modelle wiederum werden als Objekte und Diagramme gefasst, die durch verkleinerten Maßstab die Möglichkeit schaffen, etwas weitaus Größeres zu erkennen, zu begreifen und im Prozess der Konstruktion handhabbar zu machen.

Conserved Genomic Regions Influencing Energy Homeostasis in the Bovine Genome

Lea G. ZIELKE, Ralf H. BORTFELDT, Jens ASSMUS, Armin O. SCHMITT,
and Gudrun A. BROCKMANN (Berlin)

Background: Biological conservation is the process of preserving genomic regions during evolution. On the one hand, evolutionary studies help to understand historical relations between species, on the other hand they allow identifying functionally important genes based on a strong interspecies conservation (ELLEGREN 2008). Energy homeostasis plays a crucial role in higher organisms (ROSEN and SPIEGELMAN 2006). In this study previously known human genes involved in fat metabolism and thus influencing energy homeostasis were investigated. It is hypothesised that conservation of these genes in the cattle genome is indicative of a functional role in fat metabolism during lactation.

Hence, the aim of this study was the identification of homologies between cattle and other species for genes involved in fat metabolism. Fat yield was chosen as a representative phenotype and statistical analyses were performed to answer the question if conserved genes are significantly associated with this trait.

Methods: 23 human candidate genes for energy homeostasis, e.g. body weight, were identified in the literature. Their homologues in cattle, mouse and further livestock species (e.g. horse, alpaca and chicken) were extracted from the ENSEMBL database. The SNP that was nearest to or within a candidate gene was defined as the centre of that candidate region. All SNPs within 1000 kb up- and downstream of this centre-SNP were used for association studies (PLINK). Association analyses were performed between 45,334 SNPs (BovineSNP50k, Illumina) and breeding values for fat yield of 2,411 Holstein-Frisian (HF) bulls provided by VIT Verden. Data were checked for quality. SNPs with missing rate above 0.1 and minor allele frequency below 0.01 as well as individual with missing rate above 0.1 were discarded.

Results: 20 out of 23 (87 %) protein coding candidate genes had known homologues in the cattle genome. Sequence conservation ranged from 48 % to 99 % across all investigated species on the nucleotide level with similar or higher values for the corresponding protein sequences. Most of the genes (13) showed homologues in all investigated species. The 20 conserved genes were used in association analyses. 18 candidate regions showed SNPs significantly associated with milk fat yield after adjustment for multiple testing. In particular 6 regions showed levels of significance consistently across the first three lactations. The fraction of significant SNPs among all SNPs in these candidate regions ranged from 14 % to 56 %. These SNPs also remained significant after fitting the most significant SNP in the *DGAT1* region as a covariate in the model. The preliminary results indicate a good agreement between conservation of functionally important genes in fat metabolism and SNPs associated with fat yield.

References

- ELLEGREN, H.: Comparative genomics and the study of evolution by natural selection. *Mol. Ecol.* 17, 4586–4596 (2008)
- ROSEN, E. D., and SPIEGELMAN, B. M.: Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature Rev. Genet.* 3, 589–600 (2006)

Lea G. ZIELKE
Humboldt-Universität zu Berlin
Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät
Züchtungsbiologie und molekulare Genetik
Invalidenstraße 42
10115 Berlin
Bundesrepublik Deutschland
Tel.: +49 30 20936168
Fax: +49 30 20936397
E-Mail: lea.zielke@agrار.hu-berlin.de

Differences in Global Transcriptome Profile of Bovine Blastocysts Derived from Superovulated or Synchronized Cyclic Heifers

Ahmed GAD, Michael HOELKER, Franca RINGS, Nasser GHANEM, Dessie SALILEW-WONDIM, Dawit TESFAYE, Chirawath PHATSARA, Karl SCHELLANDER (Bonn), Vitezslav HAVLICEK, and Urban BESENFELDER (Wien, Österreich)

The objective of this study was to investigate the influence of the oviductal environment of only synchronized or superovulated cyclic heifers on the transcriptome profile of produced blastocysts. Simmental heifers (n = 18) were synchronized, superovulated and artificially inseminated. Half of them (n = 9) were flushed by transvaginal endoscopic means at day 2 to recover 2-cell stage embryos which transferred endoscopically to only synchronized recipients (n = 4). The remaining 9 superovulated heifers and the 4 synchronized recipients were flushed at day 7 to collect blastocysts. Influence of oviductal environment on transcriptome abundance of produced blastocysts was examined using the Affymetrix GeneChip Bovine Genome Array. Embryos from superovulation environment showed developmental retardation comparing to their counterparts developed under synchronization conditions. Array data analysis revealed a total of 454 transcripts to be differentially expressed between the two blastocyst groups. Of these, 429 and 25 were up and down regulated, respectively in the blastocysts derived from superovulated heifers in compare with the blastocysts derived from synchronized heifers. Genes involved in cellular and metabolic processes, translation, transcription and response to stress were found to be enriched in the blastocysts derived from superovulated animals. Pathway analysis showed that oxidative phosphorylation pathway was the dominant pathway and all differentially regulated genes involved in this pathway were highly abundant in the blastocysts derived from superovulated animals. These genes can be classified into 3 main categories: cytochrome c oxidase, ATP synthase and NADH dehydrogenase representing 3 out of 5 protein complexes involved in the electron transport and oxidative phosphorylation pathway. Real-time PCR confirmed the transcript abundance of 12 out of 14 genes selected for validation. In conclusion, blastocysts cultured in superovulated heifers showed significant differences in transcriptome profile compared to those cultured in synchronized animals post 2-cells stage until day 7.

Ahmed GAD
University of Bonn
Institute of Animal Science
Animal Breeding and Husbandry Group
53115 Bonn
Germany
Phone: 49 228 733594
Fax: 49 228 732284
E-Mail: ahmed.gad@itw.uni-bonn.de

Dr. Vitezslav HAVLICEK
University of Veterinary Medicine Vienna
Institute of Animal Breeding and Genetics
Veterinärplatz 1
A-1210 Vienna
Austria
Phone: 43 2272 66280601
Fax: 49 2272
E-Mail: vitezslav.havlicek@boku.ac.at

Altern in Deutschland

Die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina und die Deutsche Akademie für Technikwissenschaften acatech gründeten im Mai 2005 eine gemeinsame interdisziplinäre Akademiengruppe „Altern in Deutschland“, die auf der Grundlage der besten verfügbaren wissenschaftlichen Evidenz öffentliche Empfehlungen erarbeitete, um die Chancen der im letzten Jahrhundert erheblich gestiegenen Lebenserwartung – die „gewonnenen Jahre“ – vernünftig zu nutzen und mit den Herausforderungen des demographischen Alterns klug umzugehen.

Nova Acta Leopoldina N. F.

Bd. 99, Nr. 363 – Altern in Deutschland Band 1

Bilder des Alterns im Wandel

Herausgegeben von Josef EHMER und Otfried HÖFFE unter Mitarbeit von
Dirk BRANTL und Werner LAUSECKER

(2009, 244 Seiten, 32 Abbildungen, 1 Tabelle, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2542-3)

Bd. 100, Nr. 364 – Altern in Deutschland Band 2

Altern, Bildung und lebenslanges Lernen

Herausgegeben von Ursula M. STAUDINGER und Heike HEIDEMEIER

(2009, 279 Seiten, 35 Abbildungen, 9 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2543-0)

Bd. 101, Nr. 365 – Altern in Deutschland Band 3

Altern, Arbeit und Betrieb

Herausgegeben von Uschi BACKES-GELLNER und Stephan VEEN

(2009, 157 Seiten, 29 Abbildungen, 20 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2544-7)

Bd. 102, Nr. 366 – Altern in Deutschland Band 4

Produktivität in alternden Gesellschaften

Herausgegeben von Axel BÖRSCH-SUPAN, Marcel ERLINGHAGEN, Karsten HANK, Hendrik JÜRGES und Gert G. WAGNER

(2009, 157 Seiten, 28 Abbildungen, 2 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2545-4)

Bd. 103, Nr. 367 – Altern in Deutschland Band 5

Altern in Gemeinde und Region

Stephan BEETZ, Bernhard MÜLLER, Klaus J. BECKMANN und Reinhard F. HÜTTL

(2009, 210 Seiten, 10 Abbildungen, 11 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2546-1)

Bd. 104, Nr. 368 – Altern in Deutschland Band 6

Altern und Technik

Herausgegeben von Ulfman LINDENBERGER, Jürgen NEHMER, Elisabeth STEINHAGEN-THIESSEN,
Julia A. M. DELIUS und Michael SCHELLENBACH

(2011, 174 Seiten, 42 Abbildungen, 8 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2547-8)

Bd. 105, Nr. 369 – Altern in Deutschland Band 7

Altern und Gesundheit

Herausgegeben von Kurt KOCHSIEK

(2009, 302 Seiten, 46 Abbildungen, 18 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2548-5)

Bd. 106, Nr. 370 – Altern in Deutschland Band 8

Altern: Familie, Zivilgesellschaft und Politik

Herausgegeben von Jürgen KOCKA, Martin KOHLI und Wolfgang STREECK unter Mitarbeit von
Kai BRAUER und Anna K. SKARPELIS

(2009, 343 Seiten, 44 Abbildungen, 9 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2549-2)

Bd. 107, Nr. 371 (2009) – Altern in Deutschland Band 9

Gewonnene Jahre. Empfehlungen der Akademiengruppe Altern in Deutschland

(1. Aufl. 2009, 2. Aufl. 2010, 102 Seiten, 1 Abbildung, 12,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2550-8)

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Mapping Quantitative Trait Loci Associated with Leg Weakness Related Traits in Pigs

Watchara LAENOI¹, Muhammad Jasim UDDIN¹, Mehmet Ulas CINAR¹, Christine GROSSE-BRINKHAUS¹, Dawit TESFAYE¹ (Bonn), Elisabeth JONAS^{1,2} (Bonn; Camden, Australia), Armin M. SCHOLZ³ (Munich), Ernst THOLEN¹, Christian LOOFT¹ (Bonn), Klaus WIMMERS⁴ (Dummerstorf), Chirawath PHATSARA¹, Heinz JUENGST¹, Helga SAUERWEIN¹, and Karl SCHELLANDER¹ (Bonn)

Leg weakness problems are of special interest in the pig breeding and in the production industry as well as with regard to animal welfare. Knowledge on the genetic basis of leg weakness related traits including leg and feet score, osteochondrosis (OC) and bone mineral-related traits is limited in commercial pig breeds. The aim of this study was to identify the quantitative trait loci (QTL) affecting leg weakness related traits in a Duroc × Pietrain cross bred. A total of 310 F2 pigs were used for leg weakness related trait measurements. Leg and feet were scored following a set of attributes in live animals. OC was histologically scored at the head and condylus medialis of the left femur and humerus. A GE Lunar DPX-IQ scanner combined with the appendicular mode software was used to measure bone mineral density and bone mineral content in the whole third and fourth metacarpal bones. The animals were genotyped with 82 genetic markers to cover all porcine autosomes. The set of markers includes 79 microsatellites and 3 biallelic markers. Generalized linear models were used to identify any possible effect of sire, dam, age, sex, birth weight, daily weight gain, litter size, parity, season, slaughter weight and carcass length on the investigated traits. A total of 16 chromosomal regions including three imprinting QTL were identified on 10 porcine autosomes in this study. Most of the QTL were found on porcine chromosome (SSC) 2, 3, 5, 6 and 9. All QTL reached the 5 % chromosome-wide significance level. Among these 4 and 11 QTL reached 1 % and 5 % genome-wide significance level, respectively. All three imprinting QTL were paternally expressed, two were identified on SSC5 for fore feet score and OC at condylus medialis humeri, and one on SSC9 for OC at head of femur. Our study is the first to screen for chromosomal region underlying leg weakness related traits in a fast growing cross bred pig between Duroc and Pietrain. Therefore, this

1 Institute of Animal Science, University of Bonn, Endenicher Allee 15, 53115 Bonn, Germany.

2 Reprogen, University of Sydney, 425 Werombi Road, Camden NSW 2570, Australia.

3 Veterinary Faculty, Ludwig-Maximilians University of Munich, Germany.

4 Research Institute for the Biology of Farm Animals, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany.

study might provide valuable information to the commercial pig industry with regard to the possibility of using marker-based selection against leg weakness in pigs.

Watchara LAENOI
University of Bonn
Institute of Animal Science
Endenicher Allee 15
53115 Bonn
Germany

Dr. Elisabeth JONAS
Reprogen – Animal Biosciences Group
University of Sydney
425 Werombi Road
Camden NSW 2570
Australia
Faculty of Veterinary Science
Phone: +61 2 93511783
Fax: +61 2 93511693
E-Mail: elisabeth.jonas@sydney.edu.au

PD Dr. Armin M. SCHOLZ
Veterinary Faculty
Ludwig-Maximilians University of Munich
Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim
St. Hubertusstraße 12
85764 Oberschleißheim
Germany
Phone: +49 89 218076042
Fax: +49 89 218076041
E-Mail: Armin.Scholz@lvg.vetmed.uni-muenchen.de

Prof. Dr. Klaus WIMMERS
Research Institute for the Biology of Farm Animals
Wilhelm-Stahl-Allee 2
18196 Dummerstorf
Germany
Phone: +49 3820868 700
Fax: +49 3820868 702
E-Mail: wimmers@fhn-dummerstorf.de

Analyse der genetischen Steuerung des Haarwachstums beim Nackthund

Theresa MAUSBERG, Cord DRÖGEMÜLLER und Tosso LEEB ML
(Bern, Schweiz)

Nackthunde repräsentieren sehr alte Rassen. So wurden Mexikanische Nackthunde schon vor ca. 3700 Jahren von den Azteken verehrt, und wir vermuten, dass andere Nackthunderassen, wie der Peruanische Nackthund oder der Chinesische Schopfhund, von diesen Tieren abstammen. Der Phänotyp der Nackthunde wird als canine ektodermale Dysplasie (CED) bezeichnet, da zusätzlich zu dem kargen oder abwesenden Haarkleid auch die Zähne teilweise fehlen. CED wird monogen autosomal kodominant vererbt. Heterozygote Tiere weisen den haarlosen Phänotyp auf, homozygote Tiere hingegen sterben schon während der Embryogenese. In früheren Arbeiten konnten wir eine 7 bp-Duplikation im *FOXI3*-Gen als Ursache für den CED-Phänotyp identifizieren.

Trotz der *FOXI3*-Mutation weisen viele Nackthunde eine mehr oder weniger ausgeprägte Restbehaarung an Kopf, Beinen und Rute auf, welche beim Chinesischen Schopfhund am deutlichsten vorhanden ist. So finden sich heutzutage durch gezielte Züchtung auch Chinesische Schopfhunde, welche fast so viele Haare aufweisen, wie die behaarte Variante ohne die *FOXI3*-Mutation („Powderpuff“). Ziel der aktuellen Studie ist es nun, weitere genetische Faktoren mit einem Einfluss auf die Restbehaarung von Chinesischen Schopfhunden zu finden. Dafür wurden von 87 Chinesischen Schopfhunden Blutproben genommen und Fotografien gemacht. Die Ausprägung und Verteilung der Restbehaarung wurde mit Hilfe eines selbstentwickelten Klassifizierungsschemas beurteilt. Bei allen Tieren wurde der *FOXI3*-Genotyp untersucht. Derzeit führen wir eine genomweite Assoziationsstudie durch, um weitere Gene aufzuspüren, die das Haarwachstum beeinflussen.

Theresa MAUSBERG
Institut für Genetik
Vetsuisse-Fakultät
Universität Bern
Bremgartenstrasse 109a
3001 Bern
Schweiz
Tel.: +41 31 6312524
Fax: +41 31 6312640
E-Mail: theresa.mausberg@vetsuisse.unibe.ch

Vorträge und Abhandlungen zur Wissenschaftsgeschichte 2010

Acta Historica Leopoldina Nr. 55

Herausgegeben von Sybille GERSTENGARBE, Joachim KAASCH, Michael KAASCH,
Andreas KLEINERT und Benno PARTHIER (Halle/Saale)

(2010, 400 Seiten, 47 Abbildungen und 2 Tabellen, 23,95 Euro,
ISBN: 978-3-8047-2799-1)

Der Band enthält 11 Vorträge aus den wissenschaftshistorischen Seminaren der Leopoldina und zeigt damit die große Themenvielfalt dieser Veranstaltungen. Behandelt werden u. a. die Problemkreise „Die Natur als Magierin: Zum paracelsischen Erbe neuzeitlicher Medizin“ (H. SCHOTT), „Georg Ernst Stahls medizinische Theorie und der Pietismus des 18. Jahrhunderts“ (J. HELM), „Die tamilische Heilkunde in der Wahrnehmung der pietistischen Missionare der dänisch-halleschen Tranquebar-Mission in der ersten Hälfte des 18. Jahrhunderts“ (J. N. NEUMANN), „Matthias Jacob Schleiden und die Versammlungen Deutscher Naturforscher und Ärzte“ (I. JAHN), „Von der Adria an die Nordsee. Meeresbiologische Forschung in der Kaiser-Wilhelm-/Max-Planck-Gesellschaft“ (M. KAZEMI) und „Wandel und Wende in der ostdeutschen Wissenschaft – Pflanzenbiochemie als institutionelles Beispiel“ (B. PARTHIER). Biographische Fragestellungen verfolgen die Beiträge „Johann von Lamont (1805–1879) – ein Pionier des Erdmagnetismus“ (H. SOFFEL), „Der (un)bekannte Reformator – Wilhelm Friedrich Georg Behn (1808–1878) und die Reorganisation der Leopoldina“ (M. KAASCH) und „Bambusstrategie“. Max Planck in der NS-Zeit“ (E. HENNING). Der Abschluss eines Bandes der Leopoldina-Ausgabe von Goethes Naturwissenschaftlichen Schriften (*Zur Farbenlehre und Optik nach 1810 und zur Tonlehre*) bildet den Hintergrund eines weiteren Referates (T. NICKOL), während ethische Fragen im Fokus der Ausführungen über „Euthanasie in Geschichte und Gegenwart – im Spektrum zwischen Lebensbeendigung und Sterbebeistand“ (D. VON ENGELHARDT) stehen. Drei Abhandlungen ergänzen den Band. Sie behandeln Leben und Wirken von Otto MEYERHOF und Karl LOHMANN (E. HOFMANN) und widmen sich Fragen der Leopoldina-Geschichte, u. a. dem „Ende des Wanderlebens“ der einst mit den jeweiligen Präsidenten ihren Sitzort wechselnden Akademie (M. KAASCH) bzw. den Gründen für die schließlich dauerhafte Ansiedelung der Leopoldina in Halle an der Saale (W. BERG und M. KAASCH).

The Bi-directional Communication between Bovine Oocytes and the Companion Cumulus Cells during *In Vitro* Maturation Affects the Gene Expression of either Cell Types

Alemu REGASSA, Franca RINGS, Michael HOELKER, Ernst THOLEN,
Christian LOOFT, Karl SCHELLANDER, and Dawit TESFAYE (Bonn)

The bi-directional communication between an oocyte and adjacent cumulus cells (CCs) has been indicated to be crucial for the development and functions of both cell types. However, whether the removal of either cell during *in vitro* maturation could alter the gene expression of the other is not investigated. Here, we performed large scale transcriptome analysis of oocytes and CCs that were matured with and without either of the cells using Affymetrix bovine genome array. In experiment 1, two groups of CCs namely, those matured with ooplasm (n = 150) and with out ooplasm (OXX, n = 150) were compared. In experiment 2, two groups of oocytes namely, those matured with (n = 150) and without (n = 150) the companion CCs were compared. Both the ooplasm and CCs were removed from either of the cells at germinal vesicle stage and all cells were matured in modified parker medium supplemented with 10 % FSH for 22 hrs in humidified atmosphere containing 5 % CO₂. Total RNA was isolated using Pico pure total RNA isolation kit and 12 nano grams of total RNA from each sample was used for the two-round cDNA synthesis and subsequent *in vitro* transcription. 15 µg of fragmented and biotin-labelled cRNA from each sample was hybridized with Affymetrix bovine Genome 430 v2.0 GeneChip® array, and data was analysed using bio conductor integrated statistical packages under R software environment. Differentially expressed genes were classified according to their gene ontology (GO) using GO consortium and pathways involving differentially expressed transcripts were analysed using KEGG pathway analysis. A total of 566 transcripts were differentially expressed between CCs that were matured with oocytes and OXX of which 319 were up and 247 down regulated in CCs that were matured with oocytes, respectively. These differentially regulated transcripts are involved in transcription factor activity (FOXP2, FOS, IRF9, HOXA4, ATF3), protein dimerization activity (JUN, JUNB, DDIT3, TREX1), nucleic acid binding (LGP2, OAS1, BHLHB2, TEAD2, MYC, KLF6), insulin like growth factor binding (CTGF, IGFBP5, CYR61), dicarboxylic acid trans-membrane transporter activity (SLC1A4, SLC1A5), hyaluronan synthase activity (HAS2), extracellular matrix binding (AGRN). The results of KEGG pathway analysis revealed that genes involved in C21 steroid metabolism (HSD3B1, HSD11B1), wnt signaling (JUN, CCND2, TCF7, SFRP1), p53 signaling (CCNB2, CCND2, CCNE2), focal adhesion (CAV1, 2, VEGFA, KDR), biosynthesis of steroids (MVK, NQO1) and TGF beta signaling (ID1, PITX2, MYC, SP1) pathways were significantly affected due to removal of CCs during *in vitro* maturation. Similarly, 265 transcripts were differentially expressed between oocytes that were matured with and with out their companion CCs of which 217 were up and 48

down regulated in oocytes that were matured with companion CCs. Some of these transcripts include those involved in aconitate hydratase activity (ACO1, 2), RNA binding (POLR2G, RBM5), GTPase activity (TUFM, TUBB), aldehydeoxidase activity (AOX1), creatine transporter activity (SLC6A8) and peptidase activity (CCDC21). The KEGG analysis of these differentially expressed genes has also shown that citrate cycle (ACO2, SDHB), MAPK signaling (MAP3K3, MAP4K2), vitamin B6 metabolism (AOX1) and cell cycle (CDC6, ORC5L) pathways were significantly changed due to removal of CCs during *in vitro* maturation. In conclusion, this study has identified several candidate genes that might play an important role in the bidirectional communication of the oocyte and its companion cumulus cells during *in vitro* maturation.

Dr. Alemu REGASSA
Institute of Animal Sciences
Animal Breeding and Husbandry Groups
University of Bonn
Endenicher Allee 15
53115 Bonn
Germany

Diestrus Transcriptome Dynamics of Bovine Endometrium in Relation to Pregnancy Success after Embryo Transfer

Dessie SALILEW-WONDIM, Michael HOELKER, Franca RINGS, Ernst THOLEN, Karl SCHELLANDER, and Dawit TESFAYE (Bonn)

The aim of this experiment was to investigate the transcriptome dynamics of endometrium between day 7 and 14 of the oestrus cycle in cows that resulted in calf delivery or no pregnancy after embryo transfer. For this, endometrium samples were collected using cytobrush technique from Simmental cyclic heifers during day 7 and 14 of oestrus cycle. On the next cycle, *in vivo*-produced day 7 blastocysts were transferred to all animals at day 7 of oestrous cycle. After pregnancy diagnosis, the endometrial biopsies collected during day 7 and 14 were classified based on the pregnancy success. Those endometrial biopsies collected from heifers that subsequently delivered a calf were assigned to the calf-delivery group, and those collected from heifers that did not conceive were assigned to the no-pregnancy group. The endometrial temporal transcriptome profile was compared between day 7 and day 14 in both heifer groups. Total RNA was isolated from each sample in triplicate. Two rounds of RNA amplification were performed using MEGAscript® T7 Kit (Ambion, Inc., Austin, TX, USA) and GeneChip® IVT Labeling Kit (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), respectively. Following fragmentation, biotin-labelled cRNA samples were hybridized to Affymetrix bovine gene chip array. The microarray data normalization and background correction were performed using GCRMA, and the differentially expressed genes (DEG) (fold change ≥ 2 , $P < 0.05$, FDR ≤ 0.3) were identified using LIMMA written on R package integrated with Bioconductor. The result showed that in the calf-delivery group, there were 1867 DEG, among which 1015 and 852 were up- and down-regulated, respectively, in day 7 compared with day 14 of the oestrous cycle. Some of those genes are believed to be involved in reproductive system development and function, embryonic development and nervous system development and function. On the other hand, in the no-pregnancy group, 254 genes were found to be differentially expressed, of which 160 and 94 were up- and down-regulated, respectively, in day 7 compared with day 14 of the oestrous cycle. Some of these genes were found to be involved in signal transducer activity, transferase activity, receptor, regulation of transcription, signal transduction. In conclusion, the result of the current study revealed a remarkable transcrip-

tome dynamics between day 7 and 14 of the oestrous cycle in cows resulted in calf delivery compared with those that did not support pregnancy.

Dr. Dessie SALILEW-WONDIM
University of Bonn
Institute of Animal Science
Animal Breeding and Husbandry Group
Endenicher Allee 15
53115 Bonn
Germany
Phone: 49 228 733385
Fax: 49 228 732284
E-Mail: dsal@itw.uni-bonn.de

Mapping QTL for Cytokines and Toll-like Receptors in a Duroc × Pietrain Resource Population

Muhammad Jasim UDDIN, Mehmet Ulas CİNAR, Christine GROSSE-BRINKHAUS, Dawit TESFAYE, Ernst THOLEN, Chirawath PHATSARA (Bonn), Klaus WIMMERS (Dummerstorf), Christian LOOFT, and Karl SCHELLANDER (Bonn)

Cytokines and Toll-like receptors are basic components of the innate immune system. Immune responses are reported to be under genetic control. QTL mapping and candidate gene studies have been widely used to investigate genetic variation, to identify chromosomal regions and genes contributing to immune response but very few QTL studies are devoted for immune traits. Therefore, this research was conducted to identify chromosomal regions controlling the variability in cytokines (*IL-2*, *IL-10* and *IFN-γ*) and Toll-like receptors (*TLR-2* and *TLR-9*) production by QTL analyses. A total of 334 Duroc × Pietrain F2 animals used for QTL analysis was genotyped by 82 genetic markers. Blood was collected from pigs at 52, 83 and 115 days of age and serum was separated for phenotyping. *IL-2*, *IL-10* and *IFN-γ* were measured by sandwich-ELISA (Invitrogen). *TLR-2* and *TLR-9* were measured by in house developed indirect-ELISA (CosmoBio). Descriptive statistics were performed by using SAS (vs. 9.2) whereas QTL Express was used for both single and two-QTL analysis. A total of 67 single QTL were detected on almost all porcine autosomes of which 38 for cytokines and 29 for TLRs. All the QTL were significant at 5 % chromosome wide level of which 12 and 52 QTL were significant at 1 % and 5 % genome-wide level, respectively. Moreover, 10 QTL were identified by two-QTL model of which three were in coupling phase and two were in repulsion phase. *IFN-γ*, *IL-10* and *TLR-9* are found to be controlled by the chromosomal regions of their location but all innate immune traits are influenced by multiple chromosomal regions implying multiple gene action. Most of our QTL are supported by the presence of genes which play immunologically important roles and disease resistance related QTL. *TOLLIP*, *TRAF6*, *IRAK4* and *CASP8* are found to be influencing TLRs production whereas *IL3*, *IL5*, *IL13*, *IL10*, *IFN-γ* and *BPI* are influencing cytokines in this study. Discovery of such QTL will facilitate the identification of candidate genes for innate immune response, disease resistance and immune competence that might be applicable in selective breeding.

Muhammad Jasim UDDIN
Institute of Animal Science
Animal Breeding and Husbandry / Genetics group
Endenicher Allee 15
53115 Bonn
Germany
Phone: +49 228 733586
Fax: +49 228 732284
E-Mail: jasim.uddin@itw.uni-bonn.de

Prof. Dr. Klaus WIMMERS
Research Institute for the Biology
of Farm Animals
Wilhelm-Stahl-Allee 2
18196 Dummerstorf
Germany
Phone: +49 3820868 700
Fax: +49 3820868 702
E-Mail: wimmers@fhn-dummerstorf.de

Aufklärung und Wissenschaft

Meeting veranstaltet von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, dem Interdisziplinären Zentrum für die Erforschung der Europäischen Aufklärung (IZEA) und dem Seminar für Philosophie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vom 25. bis 26. Januar 2007 in Halle (Saale)

Acta Historica Leopoldina Nr. 57

Herausgegeben von Rainer ENSKAT und Andreas KLEINERT (Halle/Saale)

(2011, 135 Seiten, 20,50 Euro, ISBN: 978-3-8047-3029-8)

Ist Aufklärung durch Wissenschaft möglich oder ist Aufklärung trotz Wissenschaft nötig? Die Frage verweist auf das exponentielle Wachstum, das die Wissenschaft in der Neuzeit durchgemacht hat. Einerseits ist Wissenschaft das dynamischste Unternehmen zugunsten eines methodisch kontrollierbaren Erwerbs von Erkenntnis und Wissen, andererseits erreichte sie eine fast unheimlich anmutende technische Tragweite. Es ist diese technische Tragweite, die die Wissenschaft erst zu einer Lebenspotenz macht. Der vorliegende Band fragt nach, ob diese unverzichtbare kognitive und technische Lebenspotenz auch schon eine Aufklärungspotenz ist. Die hier versammelten Referate tragen – meist anhand der Erörterung historischer Beispiele – dazu bei, das Bewusstsein für eine zwischen Aufklärung und Wissenschaft verlaufende Grenzlinie zu schärfen, deren Vernachlässigung erfahrungsgemäß allzu leicht zu wildwüchsigen Erscheinungen sowohl in den Bemühungen um die Aufklärung als auch in den Bemühungen um den wissenschaftlichen Fortschritt führen.

Altered Expression of Uterine MiRNAs and Related Molecular Pathways in the Context of Subclinical Endometritis in Bovine

Dagnachew WORKU, Michael HOELKER, Franca RINGS (Bonn),
Marc DRILLICH (Wien), Wolfgang HEUWIESER (Berlin), Ernst THOLEN,
Christian LOOFT, Karl SCHELLANDER, and Dawit TESFAYE (Bonn)

The aberrant expression of microRNAs has been associated with establishment and progression of various disorders in mammalian uteri. Subclinical endometritis is the presence of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in uterine cytology samples after 21 days postpartum in clinically normal dairy cows and evidenced to have a negative impact on reproductive performance. With the objective of detecting uterine miRNAs and related molecular networks and pathways, we collected endometrial cytology samples from dairy cows at flushing using cytobrush technique and categorized cows on the basis of polymorphonuclear leukocytes proportions as healthy (PMN = 0) and with subclinical endometritis (PMN > 5 %). After isolating total RNA from both healthy (n = 6) and subclinical (n = 6) groups using miRNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturers protocol, cDNA was synthesized using RT² miRNA first Strand kit (SABiosciences, Frederick, MD) from equal amount of RNA in both groups. We then used 96-well Genome RT² miRNA qPCR assay (SABioscience, Frederick, MD) and identified the differentially expressed microRNAs in subclinical endometritis as compared to their healthy counterparts. Furthermore, we filtered high ranking target genes (predicted using microcosm algorithm and available at <http://microrna.sanger.ac.uk/>) and uploaded into the web-based pathways analysis tool, Ingenuity Pathway Analysis (IPA), to identify molecular networks and biological functions underlying bovine endometritis. Here, we report that out of 352 miRNAs in which their expression was assessed, 23 were found to be differentially expressed (15 up and 8 were down regulated in sub-clinical endometritis). The expression profiling of six selected miRNAs (miR-24, miR-215, miR-27a, miR-223, miR-619, and miR-423) at different stages of estrus cycle and pregnant group (day 0, day 3, day 14 and pregnant) showed a variable expression level. The expression pattern of miR-619 and miR-423 conform the expression of estrogen hormone while the expression of miR-24 and miR-215 follows the pattern of progesterone expression during estrous cycle. The Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of the predicted target genes (680) of the 23 miRNAs revealed biological functions and molecular pathways they potentially constitute in the context of sub-clinical endometritis in bovine. The IPA identified 28 significant molecular networks underlying the biological functions which we exemplified top five networks such as: gene expression (score = 42), cell death (score = 33), connective tissue development and function (score = 32), cell signaling (score = 31), cell cycle (score = 31). Besides, 39 significant canonical pathways have been identified in which most of them are related to reproductive diseases and disorders and cellular proliferation. Taken together, we identified miRNAs with altered expression

level in bovine subclinical endometritis and subsequently traced the biological functions and molecular pathways they potentially involved in. This suggests the involvement of these miss expressed miRNAs in the development and progression of subclinical endometritis and subsequent influence on reproductive success in bovine.

Dr. Dagnachew WORKU
University of Bonn
Animal Breeding and Husbandry Group
Endenicher Allee 15
53115 Bonn
Germany

Prof. Dr. Marc DRILLICH
Herd Management in Ruminants
University of Veterinary Medicine Vienna
Veterinärplatz 1
A-1210 Wien
Austria
Phone: 43 1 250775296
E-Mail: Marc.Drillich@vetmeduni.ac.at

