



**Leopoldina**  
Nationale Akademie  
der Wissenschaften

# NOVA ACTA LEOPOLDINA

Neue Folge | Band 119 | Nummer 402

## **Erbfehler und Erbkrankheiten – „Ersünden“ ohne Sündenfall?**

**Gottfried Brem (Hrsg.)**



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –  
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2015**

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Erbfehler und Erbkrankheiten – „Erbstünden“ ohne Sündenfall?



# NOVA ACTA LEOPOLDINA

Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Herausgegeben von Jörg HACKER, Präsident der Akademie

---

NEUE FOLGE

NUMMER 402

BAND 119

---

## **Erbfehler und Erbkrankheiten – „Ersünden“ ohne Sündenfall?**

Gemeinsames Symposium der  
Österreichischen Akademie der Wissenschaften (ÖAW)  
und der  
Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina –  
Nationale Akademie der Wissenschaften

am 21. und 22. März 2013 in Wien

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

Mit 32 Abbildungen und 14 Tabellen



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –  
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2015  
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:

Das Titelbild ist der Publikation BREM, G., WANKE, R., HONDELE, J., und DAHME, E.: Zum Auftreten des Arachnomelie-Syndroms in der Brown-Swiss × Braunvieh Population Bayerns. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 97/11, 393–397 (1984) entnommen und zeigt eine Fehlbildung des Knochenwachstums mit Dolichostenomelie (Verlängerung und Umfangsverminderung der Röhrenknochen) und Brachygnathie bei einem Merkmalsträgerkalb mit dem Letalfaktor Arachnomelie-Syndrom der Rasse Brown-Swiss × Braunvieh.

#### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

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

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

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.

© 2015 Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e. V. – Nationale Akademie der Wissenschaften

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

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

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

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

Printed in Germany 2015

Gesamtherstellung: Elbedruckerei Wittenberg

ISBN: 978-3-8047-3414-2

ISSN: 0369-5034

Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier.

# Inhalt

DENK, Helmut: Eröffnung und Grußwort .....	7
BREM, Gottfried: Von Wechselbälgern bis zu Founderstieren .....	9

## I. Entdeckung und Beschreibung von Erbfehlern/Erbkrankheiten

LEEB, Tosso: Genomsequenzierungen zur schnelleren Aufklärung von Erbkrankheiten beim Hund .....	21
BRENIG, Bertram, HENNECKE, Silvia, BECK, Julia, URNOVITZ, Howard B., NEUMANN, Stephan, und SCHÜTZ, Ekkehard: Strukturelle Genomveränderungen des caninen Mammakarzinoms und deren Nachweis in zirkulierenden Nukleinsäuren .....	31
WIMMERS, Klaus: Die Genetik der Gesäugequalität beim Schwein .....	37
LÜHKEN, Gesine: Molekulare Aufklärung von Erbdefekten bei Schafen und Ziegen unter besonderer Berücksichtigung eines Hypopigmentierungssyndroms beim Kamerunschaf .....	45
REISSMANN, Monika: Fellfarben beim Pferd – Mutationen und ihre pleiotropen Effekte .....	59

## II. Neue diagnostische Verfahren

FRIES, Ruedi: Vorausschauende Erbfehlerdiagnostik durch Re-Sequenzierung von Schlüsselalenen .....	77
MEDUGORAC, Ivica: Indirekte und direkte Diagnostik monogener bedingter Merkmale in der Tierzucht .....	83

## III. Tierschützerische und zuchtstrategische Entscheidungen

ZINOVIEVA, Natalia, GLADYR, Elena, KOSTJUNINA, Olga, und BREM, Gottfried: Zur Erbfehlerdiagnostik-Situation in russischen Nutztierassen .....	97
PAUSCH, Hubert, JUNG, Simone, und FRIES, Ruedi: Das Management von „neuen“ Erbkrankheiten beim Fleckvieh .....	105

SWALVE, Hermann H., und WENSCH-DORENDORF, Monika: Umgang mit Erbfehlern in der Holsteinzucht in Deutschland . . . . .	111
THALLER, Georg: Wie soll die Zucht mit Erbfehlern umgehen? Konzepte und Perspektiven (Zusammenfassung) . . . . .	123
LEEB, Tosso: Aufklärung erblicher Merkmale beim Pferd: Auch monogen vererbte Merkmale können sich als schwierig herausstellen! (Zusammenfassung) . . . . .	125
SÖLKNER, Johann, DRÖGEMÜLLER, Cord, MÜLLER, Simone, MÜLLER, Mathias, GREDLER, Birgit, und LEEB, Tosso: Rasches Auffinden von kausalen Mutationen bei rezessiven Erbfehlern durch Homozygotie-Kartierung und Sequenzierung (Zusammenfassung) . . . . .	127

#### **IV. Modelle für die medizinische Forschung**

AIGNER, Bernhard: Phänotyp-basierte Erstellung von Krankheitsmodellen in chemisch induzierten Mausmutanten . . . . .	131
WANKE, Rüdiger, WOLF, Eckhard, AIGNER, Bernhard, und KEMTER, Elisabeth: Durch ENU-Mutagenese generierte murine Nephropathiemodelle . . . . .	147
WOLF, Eckhard, BURKHARDT, Katinka, BLUTKE, Andreas, KRAUSE, Sabine, WUENSCH, Annegret, KESSLER, Barbara, ZAKHARTCHENKO, Valeri, KUROME, Mayuko, KEMTER, Elisabeth, WANKE, Rüdiger, LOCHMÜLLER, Hanns, WALTER, Maggie C., und KLYMIUK, Nikolai: Maßgeschneiderte Schweinemodelle für monogene Erbkrankheiten des Menschen . . . . .	157
BURGSTALLER, Jörg, und BREM, Gottfried: Konsequenzen artifizieller mitochondrialer Heteroplasmie im Tiermodell . . . . .	167
MÜLLER, Mathias: Mutante Modelle und Erbfehler – das Janus-Gesicht der Signalübertragung (Zusammenfassung) . . . . .	179

## Eröffnung und Grußwort

Helmut DENK, ML, wM ÖAW (Wien, Österreich)

Präsident der Österreichischen Akademie der Wissenschaften

Ich darf Sie im Namen der Österreichischen Akademie der Wissenschaften und der Deutschen Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina sehr herzlich beim Symposium „Erbfehler und Erbkrankheiten – ‚Ersünden ohne Sündenfall?‘ begrüßen.

Auf die religiös-philosophische Komponente dieses Themas, nämlich die Frage: „*Ersünden ohne Sündenfall?*“, kann ich mich wegen fehlender Kompetenz nicht einlassen. Ich kann mich nur darauf beziehen, was ich in der Schule im Religionsunterricht gelernt habe (das ist allerdings schon einige Zeit her!). Meine Meinung wäre, dass es eine Erbsünde, also die Erlangung einer Sünde mit den entsprechenden Sündenstrafen über den Erbweg, ohne vorangegangenen Sündenfall nicht geben kann, die Erbsünde zwar den Erben betrifft, der Sündenfall aber zwangsläufig dem Erblasser zuzurechnen ist. Aber diese Überlegungen stehen sicher nicht im Zentrum dieses Symposiums, obwohl transdisziplinäre Betrachtungsweisen durchaus der Mission einer Akademie der Wissenschaften entsprechen.

Die Erkennung und Vermeidung von Erbfehlern und Erbkrankheiten bei Tieren ist eine wirtschaftlich wichtige tierzüchterische Aufgabe; dazu ist es notwendig, die genetischen Grundlagen eines Erbfehlers oder einer Erbkrankheit zu klären, also anwendungsorientierte Grundlagenforschung zu betreiben und auf dieser Basis die Gesellschaft wissenschaftsbasiert zu informieren und zu beraten, das sind Grundprinzipien und zentrale Anliegen unserer Akademie. Ich freue mich, dass Herr BREM dieses wichtige Thema aufgegriffen hat.

Ich wünsche Ihnen eine informative Tagung, danke den Organisatoren, insbesondere unserem wirklichen Mitglied Herrn BREM, für ihr Engagement und eröffne das Symposium.

Prof. Dr. Helmut DENK  
Österreichische Akademie der Wissenschaften  
Dr. Ignaz Seipel-Platz 2  
A-1010 Wien  
Österreich



## Von Wechselbälgern bis zu Founderstieren

Gottfried BREM ML, wM ÖAW (Wien, Österreich)

### Einleitung

Tierzucht und Tiermedizin haben sich in über zehn Jahrtausenden parallel entwickelt. Ohne die eine gäbe es die andere nicht. Mit zunehmend größer werdenden Beständen nach der Domestikation traten Seuchen und Krankheiten auf, die durch die Haustierwerdung für den Menschen zum Problem wurden. Auch neue Nutzungsformen wie das Heranziehen von Tieren zum Transport von Lasten, vor dem Pflug, vor dem Streitwagen und als Reittiere führten zu neuen Behandlungsnotwendigkeiten von Tieren, man denke nur an die Entwicklung von Geschirren und den Hufbeschlag. Verletzungen, die bei Wildtieren für den Menschen als Jäger insofern relevant waren, als sie das Erlegen erleichterten, erforderten bei Haus- bzw. Zuchtieren Behandlungsversuche zum Erhalt des Besitzes. Mit der Haustierwerdung entstand neben der Notwendigkeit der Fürsorge mit Fütterung und Haltung auch die tierärztlich ausgerichtete Versorgung und Nachsorge. Geleistet wurde diese von „Medizinern“ und von den für die Tiere Verantwortlichen, also den Hirten. Seit 5000 Jahren sind tierärztlich ausgerichtete Ansätze dokumentiert, und seit 3000 Jahren gibt es erste gesetzliche Regelungen.

Hinweise auf **Erbfehler** bei Tieren finden sich erst relativ spät. Fündig wird man aber direkt oder indirekt im Humanbereich beispielsweise durch die mit der Erbfehlerproblematik vergesellschaftete Eugenik. Schon in der altgriechischen Philosophie spricht sich PLATON (427–347 v. Chr.) in der *Politeia* (*Politeía* = „Staat“, verfasst um 370 v. Chr.) u. a. explizit für Eugenik, also Auslese und Erbgesundheitslehre aus. Interessant ist, dass er im vierten Buch, dem Buch über die Gerechtigkeit, das Staatsmodell provokant um die weitgehende Gleichberechtigung von Frauen und Männern erweiterte. Ich zitiere eine wörtliche Übersetzung: „Keine Aufgabe, Beschäftigung oder Tätigkeit derer, die den Staat verwalten, gibt es für die Frau, weil sie eine Frau ist, oder für den Mann, weil er ein Mann ist.“ Das ist beachtenswert, denn die tatsächliche vollständige Umsetzung dieses Prinzips beanspruchte noch mehr als 2300 Jahre und beschäftigt uns heutzutage an den Universitäten mit einer von der Politik vorgegebenen zwingenden 40 % Frauenquote für alle Gremien – ob die Frauen wollen oder nicht!

PLATONS allgemeine Staatslehre wurde – allerdings nicht wegen seiner These zur Gleichberechtigung – bereits von seinem Schüler ARISTOTELES (384 v. Chr. – 322 v. Chr.) kritisiert. In neuerer Zeit war es vor allem der 1902 in Wien geborene weltberühmte Philosoph und Wissenschaftstheoretiker Karl POPPER (†1994), seit 1982 Ehrenmitglied der ÖAW, der u. a. den geistigen Wurzeln des Totalitarismus nachspürte. POPPER kritisiert geschlossene Denksysteme und Ideologien, die er bereits in den Schriften PLATONS begründet sieht und meint, der „ideale

Staat“ PLATONS sei ein totalitär ausgerichtetes Gemeinwesen, wo die besten Männer und Frauen möglichst oft Kinder zeugen sollten, die anderen möglichst selten.

In Martin LUTHERS (1483–1546) deutschsprachiger Bibel von 1545 findet man unter Erbfehler nichts, aber der Begriff „Fehl“ kommt sehr eindrücklich vor, z. B. im 3. Buch Mose, Kapitel 21, wenn der HERR zu Mose spricht: „Rede mit Aaron: Wenn an jemand deiner Nachkommen in euren Geschlechtern ein Fehl ist, der soll nicht herzutreten, dass er das Brot seines Gottes opfere. Denn keiner, an dem ein Fehl ist, soll herzutreten; er sei blind, lahm, mit einer seltsamen Nase oder der an einem Fuß oder einer Hand gebrechlich ist oder höckerig ist oder ein Fell auf dem Auge hat oder schielt oder den Grind oder Flechten hat oder der gebrochen ist. Er soll nicht zum Altar nahen, weil der Fehl an ihm ist, dass er nicht entheilige mein Heiligtum.“ Das ist – typisch alttestamentarisch – auch eine massive Ausgrenzung von menschlichen Erbfehlerträgern.

Wie Sie vielleicht beim Betreten des Akademiegebäudes bemerkt haben, tagen wir hier quasi im Schatten der auf der Ostseite des Ignaz-Seipel-Platzes liegenden Jesuitenkirche. Der Untertitel unseres Symposiums „Erbsünde ohne Sündenfall?“ harrt hier noch einer kurzen Erläuterung. Diejenigen, die im System christlicher Wertvorstellungen aufgewachsen sind, kennen den theologischen Begriff der Erbsünde, die semantische Nähe von Erbsünde und Erbfehler ist offensichtlich.

Die **Erbsünde** ist theologisch die *peccatum originale*, also eigentlich die ursprüngliche Sünde. Die klassische Definition ist: „Die Sünde Adams ist durch Abstammung, nicht durch Nachahmung auf alle seine Nachkommen übergegangen“ ... und „Die Erbsünde wird durch natürliche Zeugung fortgepflanzt“ (OTT 1970). Begriffe wie Abstammung, Zeugung, Fortpflanzung und Nachkommen sind dem Tierzüchter sehr vertraut, schwerer tut er sich mit der Definition für Erbsünde als der „durch den Sündenfall dem Menschen angeborenen Sündhaftigkeit“.

Beruhigen mag in diesem Zusammenhang, dass die Erbsünde in der Bibel gar nicht auftaucht! Wir verdanken sie dem Kirchenvater AUGUSTINUS (354–430), der im 5. Jahrhundert in Nordafrika die Sünde Adams in der Übertretung des Gottesgebots sah, nicht vom Baum der Erkenntnis zu essen. „Alles Übel“, schrieb AUGUSTINUS, „hat in dieser einen Tat seine Wurzel.“ Mittlerweile gibt es nicht wenige, die die traditionelle Erbsündenlehre schlicht für „einen Anachronismus“ halten. Sie hoffen auf den Abschied von der Erbsünde, nachdem die Kirche der durch AUGUSTINUS „irregeleiteten“ Tradition 1500 Jahre gehuldigt habe.

Im Mittelalter treffen wir auf den heute weitgehend vergessenen altertümlichen Begriff des „**Wechselbalgs**“. In dieser Zeit stand das heute veraltete „Balg“ für „Säugling“. Ausgehend von heidnischen Vorstellungen wurden im Aberglauben und bis hinein ins 19. Jahrhundert behinderte oder missgebildete Babys häufig als Wechselbalg apostrophiert. Wechselbälger hatten angeborene Abnormitäten wie überzählige Finger, bestanden nur aus einem Leib ohne Glieder oder waren von zwergenhaftem Wuchs, in vielen Fällen besonders hässlich, hatten große unförmige Schädel, starre oder schielende Augen, waren schwach und kränklich. Da es zu damaliger Zeit völlig unerklärlich war, wie es zu Fehlbildungen kommen konnte, schob man sie kurzer Hand dem Teufel zu. Dahinter stand die Glaubenspraxis, dass der Teufel oder eine seiner Genossinnen, so da sind Druden oder Hexen, einer Wöchnerin den Säugling weggenommen und ihr ein eigenes Teufelskind untergeschoben hat, sprich es ausgewechselt hat. Es gibt dazu umfangreiche Literatur, und es verwundert nicht, dass speziell in Zeiten der Hexenverfolgung das Phänomen der Wechselbälger eine große Rolle gespielt hat.

Die Vorstellung, dass der Teufel ein neugeborenes Kind gegen einen Wechselbalg austauscht, findet sich auch in der Legende des heiligen STEPHANUS (1 n. Chr. – ca. 36/40 n. Chr.), des ersten christlichen Märtyrers. STEPHANUS soll so ein weggenommenes Kind gewesen sein und nur dadurch überlebt haben, dass er von einer Hirschkuh gesäugt worden ist, bis er bei Bischof JULIAN landete und von diesem auf- und erzogen wurde. STEPHANUS, der durch Steinigung ums Leben kam, ist übrigens auch ein Patron der Pferdeknechte, was wohl auf vorchristliche Kultbräuche zurückgeht. Den Wienerinnen und Wienern ist der Hl. STEPHANUS bestens vertraut, ja geradezu ans Herz gewachsen, ist er doch Namenspatron des Wiener Stephansdoms, umgangssprachlich liebevoll Steffl genannt, des wohl bekanntesten Wahrzeichens der Stadt – in dessen Sichtweite wir heute tagen.

Wechselbälger, deren Entstehung dem Wirken von Dämonen zugeschrieben wurde, inspirierten die Entstehung vieler Gräuel- und Legendengeschichten. Selbst die heute wegen ihrer magisch-naturmedizinischen Werke noch hoch geachtete und geschätzte Kirchenlehrerin Hildegard VON BINGEN (1098–1179), die bedeutendste Universalgelehrte ihrer Zeit – sie wurde am 10. Mai 2012 von Papst BENEDIKT XVI. heilig gesprochen –, war nicht frei davon. Sie führte „Eigenschaften der belebten Natur“ regelmäßig auf Teufel, Druden oder Hexen zurück. Die Kirche übernahm auch hier heidnische Vorstellungen und ließ als Gegenspieler der frommen Menschen Teufel und Hexen an Stelle alter Dämonen auftreten.

Schlimm wurde es bei Erasmus FRANCISCI (1627–1694), der in seinem Werk *Der Höllische Proteus* (Nürnberg, 1695) schrieb – ich zitiere: „Es ist bekannt, dass Etliche den Wechselbalg gleich auf den Misthaufen geworfen und bald hernach ihr rechtes Kind wieder bekommen haben. Prügel und üble Behandlung des Wechselbalgs sollten oft bewirken, dass die Hexen ihr Kind wieder nahmen und das wirkliche zurückbrachten. Konnte ein Wechselbalg nicht zurückgetauscht werden, so wurde er in der Regel getötet. Ein anderer Versuch, das rechtmäßige Kind zurückzuerhalten war, den Wechselbalg einzuschüchtern, indem man ihn mit kochendem Wasser übergoss.“

Auch LUTHER wollte laut seiner Tischrede von 1540 Wechselbälger töten lassen, da sie nur ein Klumpen Fleisch, eine *massa carnis*, ohne Seele seien. LUTHER stellte allerdings auch fest, „dass der Papst ein verummeter leibhaftiger Teufel ist“, worauf der italienische Franziskanerpriester SINISTRARI (1622–1701) konterte, „der verdammte Ketzler Martin Luther“ sei aus der Vereinigung des Teufels mit einem Menschen hervorgegangen.

Erst nachdem ab dem 17. Jahrhundert die Naturwissenschaft als eigenständige Disziplin aus der Philosophie ausgegliedert worden war, interessierten sich naturwissenschaftlich orientierte Universitätsgelehrte für Wechselbälger, an deren Stelle ab dem Ende des 18. Jahrhunderts dann die Wolfskinder traten. Sie wurden von Carl VON LINNÉ (1707–1778), dem Begründer des Systems zur Kategorisierung von Lebewesen in Gattungen und Arten, einer besonderen Menschengattung namens *Homo sapiens ferus* zugeordnet und teilten mit den Wechselbälgern die Eigenschaften, die sie als Außenseiter charakterisierten: fehlendes Sprachvermögen, eine Form von Schwachsinn, ausdruckslose Augen, rastloser Blick, unkontrollierte Verhaltensweisen, tierische Essgewohnheiten und stereotype Bewegungen.

Neben der Kirche treffen wir auch auf einen Erbfehler in der Philosophie des 19. Jahrhunderts. Kein geringerer als Friedrich NIETZSCHE (1844–1900) sagt in seinem Werk *Menschliches, Allzumenschliches* im ersten Hauptstück „Von den ersten und letzten Dingen“, „dass alle Philosophen den gemeinsamen Erbfehler an sich haben, dass sie vom gegenwärtigen Menschen ausgehen und durch eine Analyse desselben an's Ziel zu kommen meinen, dass Mangel an historischem Sinn der Erbfehler aller Philosophen ist“. Natürlich meinen weder NIETZSCHE



noch die ihn Zitierenden mit dem Begriff Erbfehler das, was wir damit subsumieren, also gewiss keinen vererbten Mangel, sondern einen aus der Umwelt entstandenen.

Wenden wir uns nun den ersten Theorien der Zucht zu. Schon in der Antike befassten sich Philosophen mit Herkunft und Verwandtschaft der Lebewesen. Seit dem Altertum galt, dass Merkmale, welche die Eltern während ihres Lebens erworben haben, auf die Nachkommen übertragen werden können.

Im letzten Jahrtausend kamen die Konstanztheorie und die Individualpotenz als Begriffe in die Zucht. Bis zum Beginn des 19. Jahrhunderts vertraten fast alle Naturwissenschaftler die Theorie von der **Konstanz der Arten**, die besagte, dass alle Arten in einem einmaligen Schöpfungsprozess erschaffen worden seien und es seitdem, außer dem Aussterben von Arten, keine Veränderung der Arten gegeben habe. Kreationisten (abgeleitet vom lateinischen *creatio* = „Schöpfung“) erfreuen sich vor allem in den USA großen Zuspruchs, und beharren bis heute auf der wissenschaftlichen Richtigkeit dieser Theorie.

Einen anderen Ansatz verfolgte Jean Baptiste LAMARCK (1744–1829), der die biblische Schöpfungsgeschichte ablehnte und seine Theorie auf die umweltbedingte Anpassung der Lebewesen als Artentstehung und -aufspaltung zurückführte.

Auch Carl VON LINNÉ hielt an der Konstanztheorie fest und glaubte nicht an eine Evolution. Erst die Aufklärung im 18. Jahrhundert und die naturwissenschaftlich fundierte Evolutionstheorie, die Charles Robert DARWIN (1809–1882) und Alfred Russel WALLACE (1823–1919) 1858 unabhängig voneinander veröffentlicht hatten, lieferten naturwissenschaftliche Erklärungen der Artentstehung.

Bei der Frage nach der Bedeutung des Begriffes **Individualpotenz** denkt die überwiegende Mehrheit nicht nur der männlichen Bevölkerung heutzutage an die existierende oder auch eingebildete Leistungsfähigkeit männlicher Individuen. Auf den ersten Blick wird das vom Duden bestätigt. Der Duden hat aber, wie sich das gehört, auch die zweite Erklärung parat, die tierzüchterisch nicht nur als interessant, sondern auch als bekannt angesehen werden kann, nämlich, dass „unter Individualpotenz das Ausmaß der Erbtüchtigkeit eines Zuchtieres“ verstanden wurde. Jedes Tier, auch das von gemischter Abstammung, kann die Fähigkeit besitzen, sich gut zu vererben. Tiere, die bereits Beweise für ihre gute Vererbungs-kraft geliefert hatten, bekamen einen höheren Zuchtwert. Manche Tiere, und zuweilen gerade Mischlinge, zeichneten sich durch die Fähigkeit aus, ihre individuellen Eigenschaften hervorragend zu vererben. In *Meyers Konversations-Lexikon* des Jahres 1888 hieß es: „In dem männlichen Tier ist die Individualität mehr ausgeprägt als in dem weiblichen; deshalb wird es für wertvoller gehalten. Für die Zucht kommt noch hinzu, dass ein männliches Tier für viele weibliche Tiere benutzt werden kann.“

Die Lehre von der Individualpotenz mit der Hervorhebung der Bedeutung des Individuums hatte Hermann SETTEGAST (1819–1908) aufgestellt. Als einer der bedeutendsten Tierzucht-wissenschaftler des 19. Jahrhunderts meinte er, dass jedes Tier, auch das von gemischter Abstammung, die Fähigkeit besitzen könne, sich gut zu vererben. Nach SETTEGAST hat man bei der Auswahl auf die Eigenschaften des Individuums und nicht auf dessen Rassereinheit zu sehen. Je vollkommener ein Tier in den Eigenschaften war, die sicher vererbt werden, desto wertvoller war es als Zuchttier. Im Laufe des 19. Jahrhunderts sind Tierzucht und Tiermedizin viel wissenschaftlicher geworden und haben im letzten Jahrhundert einen enormen Aufschwung erlebt.

Seit einigen Jahrzehnten beobachten wir in der Tiermedizin eine deutliche Verlagerung der Schwerpunkte. Der Trend geht im Nutztierbereich von der Einzeltiertherapie hin zur Her-

den- und Bestandsbetreuung, und in der Kleintier- und Pferdemedizin entwickeln sich bei der medizinischen Versorgung von Begleit- und Hobbytieren Standards, die sich an den in der Humanmedizin aufgezeigten therapeutischen Möglichkeiten orientieren. Es scheint, dass Nutztiere im tierärztlichen Wirken im vergleichbaren Maße in den Hintergrund geraten, wie die Kleintiermedizin in den Vordergrund rückt. Tiermedizin ist heute in weit geringerem Umfang dem Erhalt des Besitzes von einzelnen Nutztieren gewidmet. Parallel dazu hat sich die Bedeutung der Tierzucht in der Tiermedizin gewandelt. Die Wandlung des völlig von Männern dominierten Berufsalltags noch vor 100 Jahren zum heutigen 90 % Anteil an Frauen in Studium und Beruf Tiermedizin spiegelt diese Entwicklung wider, auch wenn sie nicht ursächlich war. Von den meisten Studenten wird Tierzucht nur mehr als prüfungsrelevante Randerscheinung wahrgenommen und nicht als bildungsrelevant eingeschätzt. Erbfehler und deren Bekämpfung sowie Bestrebungen zur genetisch züchterischen Optimierung von Krankheitsdispositionen behaupten sich noch marginal gegen diesen Trend. Auch deshalb entstand die Initiative zu diesem Symposium, und so begrüße ich die erfreulich vielen teilnehmenden Studenten sehr herzlich.

Nun aber zur aktuellen Definition: Erbfehler sind Störungen normaler Vorgänge und Missbildungen, also Abweichungen von der phänotypischen Ausprägung, die eine eindeutige genetische Ursache haben. Von ihnen zu unterscheiden sind **Phänokopien** von Erbfehlern, die dieselben oder sehr ähnliche Phänotypen zeigen, aber durch Umwelteinflüsse verursacht werden.

Man kann lächelnd darüber hinweggehen, aber in Wirklichkeit liegt hier eine wichtige Wahrheit. Sie ist der Wissenschaft wohl bekannt, aber Tierbesitzer und – Sie verzeihen – auch semesterjunge Studenten tun sich manchmal schwer, Genetik und Umwelt in ihrer Wirkung auseinanderzuhalten. Alle, die diesem Symposium beiwohnen, und ich gehe davon aus, dass sich keine Kreationisten hierher verlaufen haben, werden in den nächsten zwei Tagen sehen und verstehen, wie Genetik und Umwelt grundverschieden wirken, aber ähnlich aussehende Konsequenzen haben können. Um es noch komplizierter zu machen: Sie werden auch ein Gefühl dafür bekommen, wie Umwelt genetische Information beeinflussen kann. **Epigenetik** beschäftigt sich mit der Weitergabe von vererbaren Änderungen der Genregulation, welche nicht auf Abweichungen in der DNA-Sequenz zurückgehen, auf die Nachkommen.

Das ist etwas, was wir, eine Generation vor Ihnen, damals noch nicht gelernt haben. Es war dogmatisch einfach nicht vorstellbar. Was wir kannten bzw. kennen konnten, war ein Phänomen, das als *Entwicklungsrauschen* oder *developmental noise* bezeichnet wurde und erklärte, wie genetisch identische Individuen durch zufällige und Umwelteffekte während der embryonalen und fetalen Entwicklung so modifiziert wurden, dass sich phänotypische Unterschiede manifestierten – was nichts zu tun hatte mit vererbaren Effekten. Dieses Phänomen war bei natürlicherweise entstandenen eineiigen Zwillingen lange bekannt, am leichtesten zu beobachten an unterschiedlichen Fellfarben bzw. Flecken. Bestätigt wurde es durch künstliche Generierung monozygoter Zwillinge mittels Embryoteilung und klonierten Tieren aus embryonalem und somatischem Kerntransfer.

Erbfehler und Erbkrankheiten sind mit Tod, Leiden oder Schmerzen der betroffenen Individuen verbunden und verursachen Kosten und wirtschaftliche Verluste bei Tierhaltern und -besitzern. Erbfehler und Erbkrankheiten sind bei Nutztieren nicht therapierbar, und nur selten können phänotypische Folgen gelindert werden. Deshalb zählt die züchterische Bekämpfung bei Tieren zu den vornehmsten tierzüchterischen und auch tiermedizinischen Aufgaben. Zur züchterischen Reduktion des Auftretens von Merkmalsträgern müssen die genetische Grund-

lage eines Erbfehlers geklärt und kausale genetische Veränderungen festgestellt werden. Dies ermöglicht dann züchterische Entscheidungen und präventiven Tierschutz.

Im Standardwerk von Gustav COMBERG (1910–1984) über *Die deutsche Tierzucht im 19. und 20. Jahrhundert* gibt es im Sachregister kein Stichwort zu Erbfehlern, lediglich zu erblichen Erkrankungen. Die Mitteilungen darüber beschränken sich auf eine kurze Information zum Gebiet der Blutgruppenbestimmungen durch den Wiener Arzt und Nobelpreisträger Karl LANDSTEINER (1868–1943).

Georg THALLER hat mich wieder auf einen Spruch aufmerksam gemacht, den wir als Studierende der Tierproduktion in Weihenstephan alle kannten und den wir uns wegen seiner Sinnhaftigkeit auch gemerkt haben: „Fehlerfrei – gibt’s nicht, also heißt’s entweder ledig bleiben, oder einen nehmen mit die Fehler.“ Der Tiroler Franz PIRCHNER (\*1927), mein Vorgänger als Tierzüchter an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien, hat in seiner *Populationsgenetik*, der Tierzüchter-Bibel (zumindest genauso schwer zu lesen bzw. zu verstehen), diesen Spruch Johann NESTROYS (1801–1862) an den Anfang seines Kapitels über die Selektion gestellt. Im „Original“ stammt diese tiefeschürfende Weisheit von der Köchin Peppi Amsel aus dem 1862 uraufgeführten Werk *Frühere Verhältnisse*. Diese Aussage passt perfekt zu unserem Thema, und ein Nestroy-Zitat passt immer zu einem Symposium in Wien.

PIRCHNER hatte 1980 bei verschiedenen Haustierspezies noch vergleichsweise geringe Zahlen zitiert, nämlich zwischen 10 und 50 Letal- und Semiletal-Faktoren. In der Datenbank OMIA (<http://omia.angis.org.au/home/> *Online Mendelian Inheritance in Animals*) sind heute aktuell 2835 Merkmale, Störungen oder Krankheiten bei Nutz- und Begleittieren aufgelistet, von denen über 1000 einem Mendelschen Erbgang folgen. Für knapp 500 Erbfehler ermöglichen molekulargenetische Tests, Anlageträger, also Tiere, die das Merkmal nicht zeigen, aber die genetische Anlage tragen, zuverlässig zu diagnostizieren. 1276 Erbfehler haben das Potenzial als Modelle für den Menschen. Deshalb freue ich mich, dass wir in der vierten Sitzung dazu kompetente aktuelle Entwicklungen vorgestellt bekommen.

Gerade durch die enorm zunehmende Genomische Sequenzierung ist zu erwarten, dass sich unser Wissen auf diesem Gebiet noch sehr erweitern wird. Vor drei Jahren hatten wir bei uns an der Veterinärmedizinischen Universität ein Symposium mit dem Titel „Das Gläserne Tier: Ein- und Ausblicke in Genome und Gene von Haustieren“ (BREM 2012), wo dazu bereits wichtige Ansätze vorgestellt worden sind. Heute wird versucht, für konkrete Erbfehler, die auf kleineren SNP-Chips nicht direkt bestimmbar sind, diese fehlenden Daten durch Imputing zu vervollständigen. Bei der genomischen Selektion werden Imputing-Verfahren verwendet, um gesuchte Genotypen aus 3k- oder 50-k-Typisierungen auf „high density hochzurechnen“. Das heißt, mit Imputing wird versucht, nicht typisierte SNPs zu bestimmen. Dieses Vorgehen funktioniert jedoch nur dann befriedigend, wenn gewisse Vorfahren vorher mit dem größeren Chip bereits typisiert worden sind. Darüber werden Sie in der zweiten Sitzung Näheres hören.

Die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Erbfehler und Leistung besteht, ist für die Vorgangsweise bei der Erbfehlerbekämpfung von zusätzlicher Bedeutung. Wenn kein Zusammenhang besteht, ist zu erwarten, dass die Allelfrequenz auch ohne gezielte Maßnahmen im Zuchtprogramm stabil bleibt. Gegen einen Zusammenhang respektive eine Abhängigkeit spricht, wenn beispielsweise die Allelfrequenzen bei Stieren und Kühen gleich hoch sind, wie sich das etwa beim Weaver-Syndrom (Bovine Progressive Degenerative Myeloencephalopathie) und der Arachnomelie zeigt. Aber bei der Spinalen Muskelatrophie (SMA) und der Spinalen Dysmyelinisierung (SDM) sind die Allelfrequenzen bei Stieren höher als bei Kühen.

Daher liegt hier die Vermutung nahe, dass Tiere mit heterozygotem Genotyp (Aa) besser dem Zuchtziel entsprechen. HOESCHELE und MEINERT (1990) haben mit Hilfe von Kopplungsanalysen für Weaver festgestellt, dass in neun untersuchten Stierfamilien Trägerkühe im Durchschnitt um 691 kg mehr Milch pro Laktation produzierten als Nicht-Trägerkühe. Eine Analyse von FÜRST (2000) zeigte, dass nur 6,5 % der Kühe hundertprozentig frei sind von SMA, Weaver-Syndrom und Spinnengliedrigkeit und dass es deutlich mehr Topstiere gibt, die Anlageträger für SMA sind als solche für Weaver oder Arachnomelie.

Noch ein paar Anmerkungen zur **Eugenik**. Eugenik (zusammengesetzt aus dem altgriechischen *eu* = ‚gut‘ und *genos* = ‚Geschlecht‘) heißt soviel wie „wohlgeboren“. Der britische Anthropologe Francis GALTON (1822–1911), übrigens – neben vielem anderem – auch der Erfinder des bis heute gültigen Klassifizierungssystem der Daktyloskopie und ein Cousin von Charles DARWIN, wandte sich, angeregt durch das Werk DARWINS, den Grundlagen der Vererbungslehre zu. Vor über 140 Jahren entwickelte er in der Eugenik oder Eugenetik die Anwendung wissenschaftlicher Konzepte mit dem Ziel, durch Bevölkerungs- und Gesundheitspolitik den Anteil positiv bewerteter Erbanlagen zu vergrößern, eine positive Eugenik. Negative Eugenik zielt darauf ab, negativ bewertete Erbanlagen zu verringern.

Im späten 19. Jahrhundert bezeichnete Eugenik die Erbgesundheitsforschung, -lehre, -pflege mit dem Ziel, erbschädigende Einflüsse und die Verbreitung von Erbkrankheiten zu verhüten. Im Deutschland der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts benutzte der Nationalsozialismus eugenisches Gedankengut („Rassenhygiene“) zur Rechtfertigung von millionenfachen Massenmorden und grausamen Menschenversuchen in Konzentrationslagern. Eugenische Betrachtungen spielten in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts in vielen Ländern eine Rolle. In den USA wurde 1896 im Bundesstaat Connecticut das erste Eugenikgesetz erlassen, welches Menschen mit Epilepsie, geistiger Behinderung oder psychischer Erkrankung die Heirat verbot. Weitere 32 Bundesstaaten der USA folgten mit ähnlichen Gesetzen. Ab Ende der 1920er Jahre kam es in vielen nordeuropäischen Ländern wie Dänemark, Schweden, Norwegen, Finnland, Island und Lettland zu Sterilisationsgesetzen. Den bislang letzten international öffentlichen Vorstoß formulierte James WATSON (\*1928) auf dem Symposium „Engineering the Human Germline“ 1998 in Los Angeles mit der vielzitierten Frage: „Wenn wir bessere Menschen herstellen könnten durch das Hinzufügen von Genen, warum sollten wir es dann nicht tun?“ Die damit angeschnittene Frage der Züchtung des Menschen nach Maß ist eine moderne Variante „positiver Eugenik“.

Die **Genetik** (hergeleitet vom griechischen *geneá* = ‚Abstammung‘ und *génésis* = ‚Ursprung‘) befasst sich mit den Gesetzmäßigkeiten und materiellen Grundlagen der Ausbildung von erblichen Merkmalen und der Weitergabe, also Vererbung, von Erbanlagen an die nächste Generation. Bis ins 18. Jahrhundert war Vererbung ein juristischer Begriff, der für natürliche Vorgänge keine Anwendung fand. Verwandtschaftsähnlichkeiten wurden durch das Klima, die Ernährung, die Art der Betätigungen usw., also durch spezifische lokale Faktoren und durch die Lebensweise der Individuen erklärt. Irreguläre Merkmale wurden auf irreguläre Einflüsse bei der Zeugung oder der Entwicklung des Individuums zurückgeführt. Einen radikalen Umbruch der Vorstellungen von der Vererbung brachte die Keimbahn- oder Keimplasmatheorie von August WEISMANN (1834–1914) in den 1880er Jahren.

Aufbauend auf Gregor MENDELS (1822–1884) exakten mathematischen Beschreibungen wurde im Jahr 1900 diskutiert, ob rezessive Merkmale in natürlichen Populationen allmählich verschwinden oder auf Dauer erhalten bleiben. Der deutsche Arzt Wilhelm WEINBERG (1862–1937) und der britische Mathematiker Godfrey Harold HARDY (1877–1947) fanden 1908

gleichzeitig die entscheidende Formel, die wir als Hardy-Weinberg-Gesetz kennen und die das Gleichgewicht dominanter und rezessiver Merkmale in Populationen beschreibt. In dieser Zeit wurden übrigens noch Proteine und nicht Nukleinsäuren als „Erbsubstanz“ betrachtet. Die Einsicht, dass es sich gerade umgekehrt verhält und die Nukleinsäure als Erbsubstanz angesehen werden muss, setzte sich erst 40 Jahre später durch.

Wenn es für einen Erbdefekt molekulargenetische Diagnoseverfahren gibt, ist die Tierzucht, erstmals in ihrer über 10000-jährigen Geschichte, in der Lage, Populationen prinzipiell innerhalb einer einzigen Generation gänzlich von diesem Erbdefekt zu befreien. Es ist auch möglich, die Verbreitung bestimmter Erbfehler kontrolliert zu verfolgen, wenn alle Zuchttiere bzw. deren Nachkommen beprobt und diagnostiziert werden. Durch innovative Systeme der Probengewinnung mittels Ohrstanzen beim Einziehen der Lebensohrmarken und Einschnitt-DNA-Isolationsverfahren könnten DNA-Analysen von ganzen Populationen mit vergleichsweise geringem Kostenaufwand realisiert werden.

Aufgabe der Tierzucht ist die Auswahl der richtigen Elterntiere für die folgende Generation. Dabei muss auf die Freiheit von bekannten Letal- und Defektallelen geachtet werden. Durch molekulargenetische Diagnosemöglichkeiten wird die genetische Last zunehmend zu einer solchen. In einer Population gibt es so viele rezessive Defektallele, die im homozygoten Zustand letal sind, dass jedes Individuum mehrere solcher letaler Defektallele, die auch als letale Bürde bezeichnet werden, trägt. Ein Schätzwert ist die Zahl von durchschnittlich fünf Letaläquivalenten, wobei als Letaläquivalent ein Gen bezeichnet wird, das in homozygoter Form das Erreichen der Geschlechtsreife unterbindet.

Das war zwar auch früher schon so, aber seit diese Letaldefekte in zunehmendem Maße genetisch diagnostizierbar sind, müssten sie zum Zuchtausschluss führen. „Ledig bleiben“ im Sinne NESTROYS bzw. genereller Ausschluss von der Zuchtnutzung im tierzüchterischen Sinne ist da nicht mehr machbar. Also „einen nehmen mit die Fehler“? Das ist nicht unproblematisch. So suchen wir nach Wegen, diesem Dilemma zu entkommen. Im Laufe dieses Symposiums werden wir in der ersten und zweiten Sitzung mehrmals mit dieser Problematik konfrontiert werden. Der Vorteil im tierzüchterischen Bereich, den wir uns zu Gute halten, bei der Zuchtwahl selektieren zu können, mutiert hier zur Verantwortung, mit der wir richtig umgehen müssen. Dass wir auf diesem Weg vorankommen und uns in die richtige Richtung bewegen, dazu möge dieses Symposium helfen.

Mich selbst begleitet als Tierzüchter die Erbfehlerproblematik fast mein ganzes berufliches Leben, sie war u. a. Thema meines Habilitationsvortrages in München. Als junger Tierzuchtassistent hatte ich einen ebenso jungen Doktoranden namens Sepp HONDELE, der 1986 in seiner Doktorarbeit „Felduntersuchungen über Kälberverluste und Missbildungen in Milchviehbetrieben“ 5000 Geburten erfasst hat und dabei auf einen für uns damals neuen Erbfehler beim Braunvieh, die sogenannte Arachnomelie (siehe Abb. Einband) oder Spinnengliedrigkeit, gestoßen ist. Bei weiterführenden Befragungen und Erhebungen stellte sich heraus, was wir auf Grund unserer Daten erwartet hatten, nämlich dass dieser Erbfehler in der Landeszucht durchaus bestens bekannt sein musste. Dem war auch so, Bauern und tierärztliche Kollegen nannten es „Glasknochenkrankheit“. Die betroffenen Kälber wurden im Misthaufen vergraben, aber geredet wurde darüber nur hinter vorgehaltener Hand.

Das genetische Ausmaß dieses Defektes war beträchtlich. Durch Pedigree-Analysen fand ich, dass der Gendefekt fünf Generationen früher mit Brown-Swiss-Sperma ins Land gekommen war (BREM et al. 1984). Damals gab es keine Auffälligkeiten, weil der Gendefekt in der weiblichen Braunviehpopulation nicht vorhanden war. Erst als die Söhne und Enkel der „Foun-



derstiere“, die wegen der damals laufenden Umzüchtung des Braunviehs überproportional oft eingesetzt worden waren und dann auf zunehmend mehr weibliche Nachkommen der Anlageträger trafen, traten dramatisch verlaufende Geburten auf. Dramatisch deshalb, weil nicht nur die Kälber, sondern durch den Geburtsverlauf auch die Mütter oft schwer geschädigt wurden. Als wir auf den Erbfehler Arachnomelie aufmerksam wurden, waren bereits 10 % der Kühe Anlageträger.

Die Folge war, dass ich zum Totengräber des Braunviehs abgestempelt wurde, frei nach dem Motto, den Überbringer der schlechten Nachricht zum Schuldigen zu machen. Erst als die Schweiz, wo im Nachgang zu Bayern die Arachnomelie ebenfalls gefunden wurde, konsequente züchterische Gegenmaßnahmen einleitete, begann auch in Bayern ein gewisser Umdeklarungsprozess. Nach fast zwei Jahrzehnten trat die Arachnomelie dann auch beim Fleckvieh auf. Entdeckt hat sie kurioserweise wieder der – jetzt nicht mehr junge – ehemalige Doktorand Sepp HONDELE, der in seiner niederbayerischen Großtierpraxis den ersten Fall durch Einsendung in die Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität aktenkundig machte. Man sieht halt, was man kennt. Ich war zu der Zeit schon in Wien und versuchte mit meinen Kollegen MÜLLER und LEEB, die beide heute hier sind, vergeblich an genetisches Material der Merkmalsträger heranzukommen. Wir wurden von Bayern konsequent ausgebootet und durch Verweigerung von Proben ferngehalten.

Leider ist das Bewusstsein für die Notwendigkeit der Bekämpfung von Erbfehlern in der Landesucht nicht sehr ausgeprägt. Auf Nachfrage bestätigte mir das Institut für Pathologie an unserer Universität, dass sie im Jahr maximal eine Handvoll Erbfehler-Merkmalsträger von Nutztieren aus ganz Österreich zu sehen bekommen. Diese Fälle seien in der einen oder anderen Weise so auffallend, dass sie von der Kollegenschaft als Kuriositäten fürs Museum eingestuft und deshalb eingeschickt werden. Mit einem Erbfehler-Screening hat das nicht wirklich etwas zu tun. Erfreulicherweise gibt es aber in anderen Ländern züchterisch geleitete Initiativen zur systematischen Erfassung von Erbfehlern, und auch darüber werden wir hören. So bleibt die Hoffnung, dass wir auf diesem Gebiet des präventiven Tierschutzes zu nachhaltigen Fortschritten kommen. In diesem Sinne wünsche ich uns allen interessante Vorträge und lebhaft Diskussionen.

Es bleibt mir noch, und das tue ich sehr gerne, im eigenen und stellvertretend auch in Ihrem Namen, zu danken: der ÖAW und der Leopoldina für die Durchführung des gemeinsamen Symposiums, dem Präsidium der ÖAW für die Freigabe dieses herrlichen Tagungsraumes, der Veterinärmedizinischen Universität Wien (VUW), den Organisationen und Firmen für die finanzielle Unterstützung und Frau Kati SPIESBERGER für ihren tatkräftigen und umsichtigen Einsatz bei den technischen Vorbereitungen und der organisatorischen Durchführung.

Nun aber frisch ans Werk und Glück auf!

## Literatur

- BREM, G. (Hrsg.): 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). Nova Acta Leopoldina NF Bd. 113, Nr. 388 (2012)
- BREM, G., WANKE, R., HONDELE, J., und DAHME, E.: Zum Auftreten der Arachnomelie in der Braunvieh × Brown-Swiss Population Bayerns. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 97, 393–397 (1984)
- COMBERG, G.: Die deutsche Tierzucht im 19. und 20. Jahrhundert. Stuttgart: Ulmer 1984
- FRANCISCI, E.: Der Höllische Proteus. Nürnberg: Endter 1695

*Gottfried Brem*

- FÜRST, C.: Analyse der Erbfehlersituation. Vortrag beim 2. Arbeitsseminar „Braunvieh“ im Rahmen des Forschungsprojektes Zuchtplanung und Optimierung der Zuchtprogramme für die Rassen Fleckvieh und Braunvieh. Salzburg, 23/24. Februar 2000
- HOESCHELE, I., and MEINERT, T. R.: Association of genetic defects with yield and type traits: the weaver locus effect on yield. *J. Dairy Sci.* 73/9, 2503–2515 (1990)
- HONDELE, J.: Felduntersuchungen über Kälberverluste und Mißbildungen in Milchviehbetrieben. Diss. med. vet. München 1986
- Meyers Konversations-Lexikon*: Meyers Konversations-Lexikon. Leipzig: Verlag des Bibliographischen Instituts 1888
- NIETZSCHE, F.: Menschliches, Allzumenschliches (1866). In: NIETZSCHE, F.: Philosophische Werke in sechs Bänden. Hrsg. von C.-A. SCHELER. Bd. 3. Hamburg: Meiner 2013
- OTT, L.: Grundriß der katholischen Dogmatik. Freiburg: Herder 1970
- PIRCHNER, F.: Populationsgenetik in der Tierzucht. Eine Einführung in die theoretischen Grundlagen. Hamburg u. a.: Parey 1964

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

# **I. Entdeckung und Beschreibung von Erbfehlern/Erbkrankheiten**





## Genomsequenzierungen zur schnelleren Aufklärung von Erbkrankheiten beim Hund

Tosso LEEB ML (Bern, Schweiz)

Mit 6 Abbildungen

### *Zusammenfassung*

Die Verfügbarkeit einer qualitativ hochwertigen Referenzsequenz des Hundegenoms sowie die in den letzten Jahren stark verbesserten Möglichkeiten zur genetischen Kartierung (genomweite Assoziationsstudien, Kopplungsstudien) haben die Aufklärung von Erbkrankheiten enorm erleichtert. Die OMIA-Datenbank weist so beim Hund beispielsweise 158 molekular aufgeklärte Merkmale aus, womit der Hund hier die Spitzenstellung unter den Haussäugetieren einnimmt (Stand Mai 2013). Eine weitere Effizienzsteigerung bei der Aufklärung von monogen bedingten Merkmalen beim Hund wird durch die rasanten Fortschritte in der Sequenzierungstechnologie ermöglicht. Die vollständige Re-Sequenzierung eines Hundegenoms kostet aktuell weniger als EUR 3000,- und kann inklusive der immer noch aufwändigen Datenanalyse innerhalb von ca. 2 Monaten durchgeführt werden. So verwundert es nicht, wenn diese Technologie die früher üblichen Sequenzierungen von einzelnen Kandidatengenem recht schnell ablöst. In dem Beitrag werden zwei kürzlich durchgeführte Forschungsprojekte zu Erbkrankheiten beim Hund vorgestellt: die angeborene selektive Cobalamin-Malabsorption (= Imerslund-Gräsbeck-Syndrom, IGS) beim Border Collie und die Skeletale Dysplasie 2 (SD2) beim Labrador Retriever.

### *Abstract*

In the last years the availability of a highly accurate genome reference sequence and the greatly improved technologies for genetic mapping (genome-wide association studies, linkage analyses) have greatly facilitated the molecular elucidation of hereditary diseases in dogs. The OMIA database as an example lists 158 Mendelian traits with a known causative mutation in dogs (as of May 2013). This is by far the largest number of solved Mendelian traits for any domesticated mammalian species. Further increases in the efficacy of solving Mendelian traits in dogs are being enabled by the tremendous advances in sequencing technology. The complete re-sequencing of a dog genome currently costs less than EUR 3.000,- and can be performed within 2 months – including the complex data analysis. It is therefore not surprising that the new sequencing technologies are quickly replacing the traditional Sanger-based sequencing of individual candidate genes. In this contribution two recently completed research projects on hereditary diseases in dogs will be presented: Selective cobalamin malabsorption (= Imerslund-Gräsbeck Syndrome, IGS) in Border Collies and skeletal dysplasia 2 (SD2) in Labrador Retrievers.

### **1. Genetische Forschung beim Hund**

Der Hund weist die größte phänotypische Vielfalt von allen Säugetierarten auf. So wiegt zum Beispiel 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 ge-

führt, dass sich Genetiker schon seit langem mit Rassehunden beschäftigen und der Hund ein wichtiges Modelltier für die biomedizinische Grundlagenforschung geworden ist (PENNISI 2007, KARLSSON and LINDBLAD-TOH 2008, LEEB 2012). Die genetische Forschung an Hunden wurde ganz entscheidend durch die Verfügbarkeit einer qualitativ hochwertigen und gut annotierten Genomreferenzsequenz sowie durch die Einführung von SNP-Chips und von genomweiten Assoziationsstudien vorangetrieben (LINDBLAD-TOH et al. 2005, KARLSSON et al. 2007).

Die Gendefekte für monogen autosomal rezessiv vererbte Krankheiten können in einer genomweiten Assoziationsstudie mit ca. 5–10 Fällen und ebenso vielen nicht-betroffenen Kontrollen zuverlässig kartiert werden. Im Falle von monogen autosomal dominant vererbten Merkmalen werden ca. 20 Fälle und ebenso viele Kontrollen für eine sichere Kartierung benötigt. Am Ende einer solchen Kartierung lässt sich das kritische Intervall in der Regel auf ca. 1–5 Millionen Basenpaare oder etwa 0,1 % des Hundegenoms eingrenzen.

Anschließend stellt sich jedoch häufig das Problem, das in den so kartierten kritischen Intervallen entweder kein offensichtliches funktionelles Kandidatengen liegt oder aber mögliche funktionelle Kandidatengene sehr groß und komplex strukturiert sein können. Bis vor wenigen Jahren war es die übliche Praxis, für potenzielle Kandidatengene jedes Exon einzeln mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren und dann vergleichend an Fällen und Kontrollen zu sequenzieren. Bei einem Gen mit 50 Exons sowie vier zu untersuchenden Probanden war das bereits ein experimentelles Programm, mit dem eine Doktorandin oder ein Doktorand üblicherweise mehrere Monate lang beschäftigt war. Mit den neuen Sequenzierungstechnologien lässt sich ein Hundegenom im Labor innerhalb von 2–3 Wochen re-sequenzieren. Die Auswertung der aus diesem Experiment resultierenden Datenmenge stellt allerdings zurzeit immer noch eine enorme Herausforderung dar und dauert etwa einen Monat. An zwei konkreten Beispielen soll im Folgenden erläutert werden, wie diese Technik erfolgreich eingesetzt wurde.

## 2. Imerslund-Gräsbeck-Syndrom (IGS) beim Border Collie

Cobalamin oder Vitamin B<sub>12</sub> ist ein essentieller Kofaktor für die Methioninsynthese und die Methylmalonyl-CoA-Mutase und spielt somit unter anderem eine wichtige Rolle in der *De-novo*-Synthese von Nukleotiden. Tiere und Menschen können Cobalamin nicht selbst synthetisieren, sondern sind darauf angewiesen, dieses Vitamin mit der Nahrung aufzunehmen. Für die Aufnahme des Cobalamins aus der Nahrung existiert ein spezielles Transportsystem. Cobalamin (= extrinsischer Faktor) bindet im Verdauungstrakt an ein endogenes Protein, den *Gastric Intrinsic Factor* (GIF, intrinsischer Faktor). Der Komplex aus Cobalamin und GIF wird dann von einem Rezeptor in der Schleimhaut des Dünndarms erkannt und internalisiert. Dieser Rezeptor wird Cubam-Rezeptor genannt und besteht aus zwei Proteinuntereinheiten, Amnionless (AMN) und Cubilin (CUBN, NIELSEN et al. 2012).

Mutationen im *AMN*- oder *CUBN*-Gen führen zu einer erblichen selektiven Cobalamin-Malabsorption, die nach ihren Entdeckern in der Humanmedizin heute Imerslund-Gräsbeck-Syndrom (IGS) genannt wird (GRÄSBECK 2006). Das IGS wird monogen autosomal rezessiv vererbt und kommt bei Menschen und Tieren vor. Das IGS führt zu megaloblastischer Anämie („perniziöse Anämie“ beim Menschen), Entwicklungsverzögerungen und neurologischen Schäden, sofern es nicht behandelt wird. Das IGS kann aber bei korrekter Diagnosestellung

durch parenterale Supplementation mit Cobalamin ausgezeichnet behandelt werden, so dass menschliche und tierische Patienten ein normales Leben führen können.

Beim Hund wurde das IGS bisher beim Australian Shepherd, Beagle, Border Collie, Riesenschnauzer und Shar-Pei beschrieben. Beim Australian Shepherd und beim Riesenschnauzer sind zwei unterschiedliche Mutationen im *AMN*-Gen für IGS verantwortlich, während die genetischen Defekte in den anderen Rassen bis vor kurzem nicht bekannt waren (HE et al. 2005).

Um den molekularen Defekt bei Border Collies mit IGS aufzuklären, wurde zunächst eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) mit 7 Fällen und 7 Kontrollen durchgeführt (OWCZAREK-LIPSKA et al. 2013). Diese Analyse ergab ein Signal auf Chromosom 2. Eine sich daran anschließende Homozygotiekartierung ergab, dass alle 7 Fälle in einem Bereich von 3,53 Mb homozygot für einen einzigen Haplotyp waren. Daraus wurde geschlossen, dass die kausale genetische Variante in diesem 3,53 Mb großen Bereich auf Chromosom 2 liegen sollte (Abb. 1).

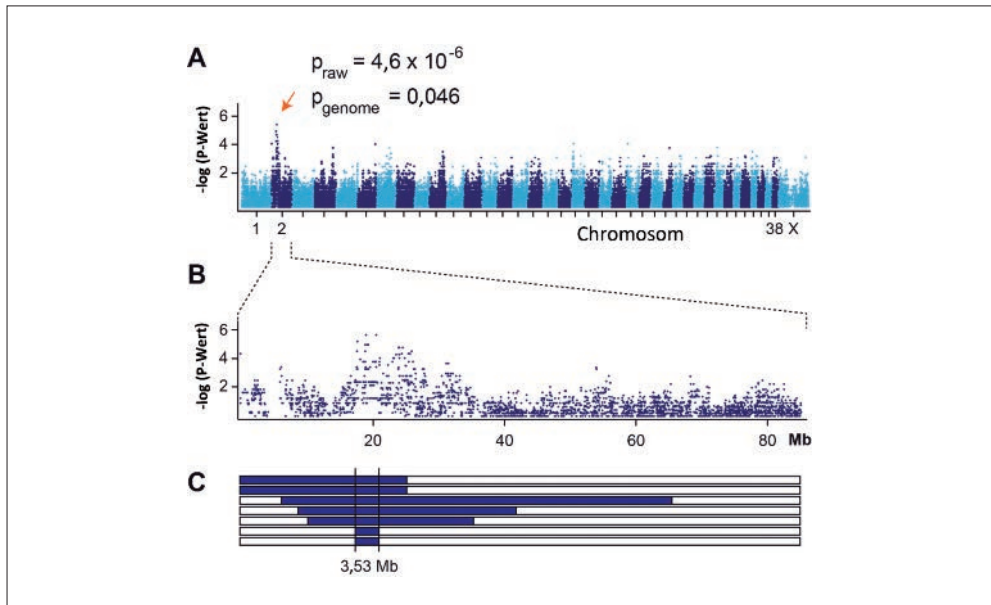


Abb. 1 Kartierung der ursächlichen Variante für IGS in Border Collies (OWCZAREK-LIPSKA et al. 2013). (A) Eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) mit 7 Fällen und 7 Kontrollen ergab eine signifikante Assoziation von Markern auf dem Chromosom 2 mit dem Merkmal IGS. (B) Eine Vergrößerung des Chromosoms 2 zeigt ein etwa 5 Mb großes assoziiertes Intervall. (C) Homozygotiekartierung der 7 Fälle. Homozygot identische Haplotypblöcke sind blau dargestellt. Der gemeinsame Bereich umfasst 3,53 Mb und definiert das kritische Intervall von Position 17 283 880 bis 20 818 258, wobei sich die Koordinaten auf das CanFam-3.1-Referenzgenom beziehen.

Das kritische Intervall enthielt mit dem *CUBN*-Gen darüber hinaus auch noch ein ausgezeichnetes funktionelles Kandidatengen für IGS. Da das *CUBN*-Gen mit seinen 67 Exons sehr groß ist, wurde die Mutationsanalyse nicht über die konventionelle PCR-Amplifikation aller einzelnen Exons, sondern über eine Gesamtgenomsequenzierung (*whole genome sequencing*, WGS) durchgeführt. Die Sequenzierung des Genoms eines IGS-betroffenen Border Collies

mit 10-facher Abdeckung auf einem illumina-HiSeq-Gerät ergab ca. 2,5 Millionen homozygote Varianten im Vergleich zur Referenzgenomsequenz eines gesunden Boxers. Im kritischen Intervall auf Chromosom 2 wurden 3173 homozygote Varianten entdeckt, von denen 17 nicht-synonym waren. Ein Vergleich von 12 weiteren Hundegenomen aus anderen Forschungsprojekten ergab, dass nur 3 von diesen 17 nicht-synonymen Varianten exklusiv bei dem Border Collie mit IGS vorkamen. Diese drei Varianten wurden dann an größeren Kohorten von Hunden genotypisiert, wodurch noch eine weitere Variante wegen unvollständiger Assoziation mit dem Phänotyp ausgeschlossen werden konnte. Nach diesen genetischen Analysen bleiben also zwei nicht-synonyme Varianten im kritischen Intervall übrig, die in starkem Kopplungsungleichgewicht standen und perfekt mit dem Phänotyp assoziiert waren. Eine dieser Varianten betraf das Mannoserezeptor C, Typ 1-Gen (*MRC1*), die zweite Variante befand sich im *CUBN*-Gen. Da *Mrc1*-defiziente Mäuse keinen klinisch auffälligen Phänotyp zeigen und gleichzeitig *CUBN* eine bekannte essentielle Rolle im Cobalamin-Stoffwechsel spielt, wurde daraus gefolgert, dass die *CUBN*-Variante höchstwahrscheinlich die kausale genetische Läsion für IGS bei den untersuchten Border Collies darstellt. Es handelte sich um eine Deletion von einer Base, die zu einer Leserahmenverschiebung und einem vorzeitigen Stoppcodon in der kodierenden Sequenz des *CUBN*-Gens führt (c.8392delC; p.Q2798Rfs\*3, Abb. 2). Diese Deletion war perfekt mit dem IGS-Phänotyp in einer Kohorte von 200 Border Collies assoziiert und kam nicht in 357 Hunden anderer Rassen vor. Unter den 200 Border Collies befanden sich 12 heterozygote Hunde, was einer Trägerfrequenz von 6,2% entspricht (OWCZAREK-LIPSKA et al. 2013). Durch die Identifizierung der vermeintlich kausalen Variante können Anlageträger nun durch einen Gentest erkannt werden. Die Zucht kann damit so gesteuert werden, dass keine IGS-betroffenen Border Collie-Welpen mehr geboren werden.

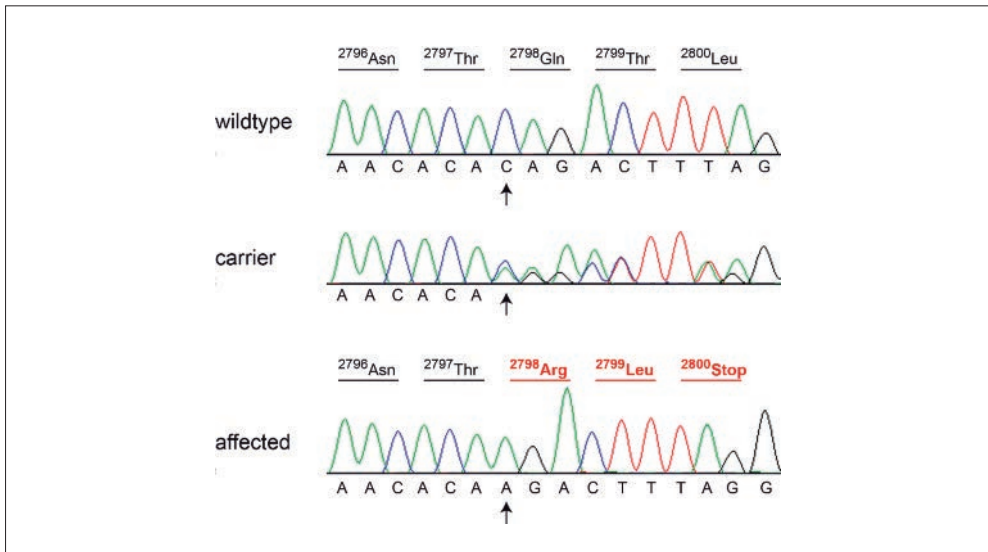


Abb. 2 Bestätigung der Deletion im *CUBN*-Gen durch Sanger-Sequenzierung (OWCZAREK-LIPSKA et al. 2013). Die Elektropherogramme eines homozygot freien („wildtype“), eines heterozygoten („carrier“) und eines betroffenen Hundes („affected“) sind dargestellt. Pfeile bezeichnen die Position der Deletion, welche zu einer Leserahmenverschiebung und einem vorzeitigen Stoppcodon führt.

Durch die vollständige Genomsequenzierung eines IGS-betroffenen Beagles konnte kürzlich auch in dieser Hunderasse eine weitere vermeintlich kausale Deletion im *CUBN*-Gen aufgespürt werden (DRÖGEMÜLLER et al. 2014).

### 3. Skeletale Dysplasie 2 (SD2) beim Labrador Retriever

Die Körpergröße ist ein Lehrbuchbeispiel für ein polygenes Merkmal. Sie weist einerseits eine hohe Erbllichkeit auf, und andererseits fällt es schwer, alle genetischen Faktoren, die die Größe beeinflussen, zu identifizieren (VISSCHER et al. 2010, LANGO ALLEN et al. 2010). Eine wertvolle Hilfe bei der Entschlüsselung dieses komplexen Merkmals sind spontane Mutationen mit großen Effekten, weil damit Gene identifiziert werden können, die an der Determination der Körpergröße beteiligt sind und bei denen vielleicht andere Varianten mit kleineren Effekten zur natürlichen Variation des Merkmals beitragen.

Bei Menschen sind mehr als 450 skeletale Dysplasien, also erbliche Störungen mit deutlichen Auswirkungen auf das Skelett, beschrieben (ALANAY und LACHMAN 2011). Auch beim Hund sind einige vergleichbare Phänotypen beschrieben worden. Am bekanntesten sind hier sicherlich die chondrodystrophischen Hunderassen, wie z. B. der Teckel, bei denen eine zusätzliche retrotransponierte Kopie des *FGF4*-Gens den kurzbeinigen Phänotyp verursacht (PARKER et al. 2009). Beim Labrador Retriever ist die Okuloskeletale Dysplasie (OSD) bekannt, welche durch eine Mutation im *COL9A3*-Gen für die  $\alpha 3$ -Untereinheit des Kollagen IX verursacht wird (GOLDSTEIN et al. 2010). Eine weitere hochgradige skeletale Dysplasie ohne Beteiligung der Augen beim Labrador Retriever wurde zwar phänotypisch charakterisiert, aber die ursächliche Mutation konnte bisher nicht gefunden werden (SMIT et al. 2011).

In einem Projekt unter Federführung der Universität Bern wurde eine milde Wachstumsstörung beim Labrador Retriever untersucht, die seit einigen Jahren vor allem in jagdlich genutzten Arbeitslinien dieser Rasse auftritt (FRISCHKNECHT et al. 2013). Betroffene Hunde weisen einen disproportionierten Zwergwuchs mit zu kurzen Beinen auf. Weitere gesundheitliche Beeinträchtigungen, wie z. B. sekundäre Arthrosen, sind jedoch nicht bekannt. Dieser Phänotyp wurde im Lauf des Projekts „Skeletale Dysplasie 2 (SD2)“ genannt (Abb. 3).

Eine Stammbaumanalyse ergab, dass SD2 monogen autosomal rezessiv vererbt wird, wobei einzelne Hunde aufgrund der normalen Schwankung in Körpergröße und Proportionen nicht eindeutig phänotypisiert werden konnten (Abb. 4). Zur Kartierung der ursächlichen genetischen Variante wurde eine GWAS mit 23 Fällen und 37 Kontrollen durchgeführt. Diese Analyse ergab ein deutliches Signal auf Chromosom 12. Das kritische Intervall unter diesem Assoziationssignal konnte durch eine Homozygotiekartierung auf 4,44 Mb eingengt werden (Abb. 5).

In diesem kritischen Intervall befanden sich 171 annotierte Gene und Loci. Um einen vollständigen Überblick über alle Varianten in diesen Genen zu bekommen, wurde das Genom eines SD2-betroffenen Labrador Retrievers mit etwa 30-facher Abdeckung sequenziert. Auch dieser Hund wies über das gesamte Genom etwa 2,5 Millionen homozygote Varianten im Vergleich zur Boxer-Referenz-Genomsequenz auf. Im kritischen Intervall wurden 10 508 homozygote Varianten detektiert, von denen 92 als nicht-synonym klassifiziert wurden. Die Genotypen an diesen 92 Positionen wurden in insgesamt 13 Hundegenomen anderer Rassen untersucht und alle Varianten ausgeschlossen, die auch in anderen Rassen als dem Labrador





Abb. 3 Phänotyp Skeletale Dysplasie 2 (SD2) beim Labrador Retriever (FRISCHKNECHT et al. 2013). (A) Bei diesem SD2-betroffenen Hund kann man den milden disproportionierten Zwergwuchs erkennen. Für die Körperlänge sind bei diesem Labrador Retriever die Beine etwas zu kurz. (B) Eine SD2-betroffene Mutter (*links*) neben ihrer nicht-betroffenen Tochter (*rechts*). (C) Drei Wurfgeschwister. Bei dem männlichen Fall („male case“) sind die zu kurzen und in diesem Fall auch zu stark gekrümmten Vorderbeine zu erkennen. (D) Röntgenaufnahme von Radius und Ulna eines 12 Monate alten nicht-betroffenen Labrador Retrievers. (E) Die Röntgenaufnahme eines SD2-betroffenen Bruders zeigt außer den verkürzten und etwas stärker gekrümmten Röhrenknochen keine weiteren pathologischen Veränderungen.

Retriever vorkamen. Damit verblieben dann noch 5 nicht-synonyme Varianten im kritischen Intervall, die exklusiv bei dem SD2-betroffenen Labrador Retriever auftraten.

Diese 5 Varianten wurden an größeren Kohorten von Hunden genotypisiert, wobei abermals zwei Varianten übrigblieben, die in starkem Kopplungsungleichgewicht standen und perfekt mit dem SD2-Phänotyp in über 700 Hunden assoziiert waren. Beide Varianten wurden nur in Labrador Retrievern, aber nicht in Hunden anderer Rassen gefunden. Eine der beiden Varianten betraf das Lymphotoxin A-Gen (*LTA*), welches keine bekannte Rolle in der Skelettbildung hat. Die andere Variante im *COL11A2*-Gen führte zu einem Aminosäureaustausch in der  $\alpha 2$ -Untereinheit des Kollagens XI (c.143G>C; p.R48P). *COL11A2* ist ein bekannter Bestandteil der Wachstums-

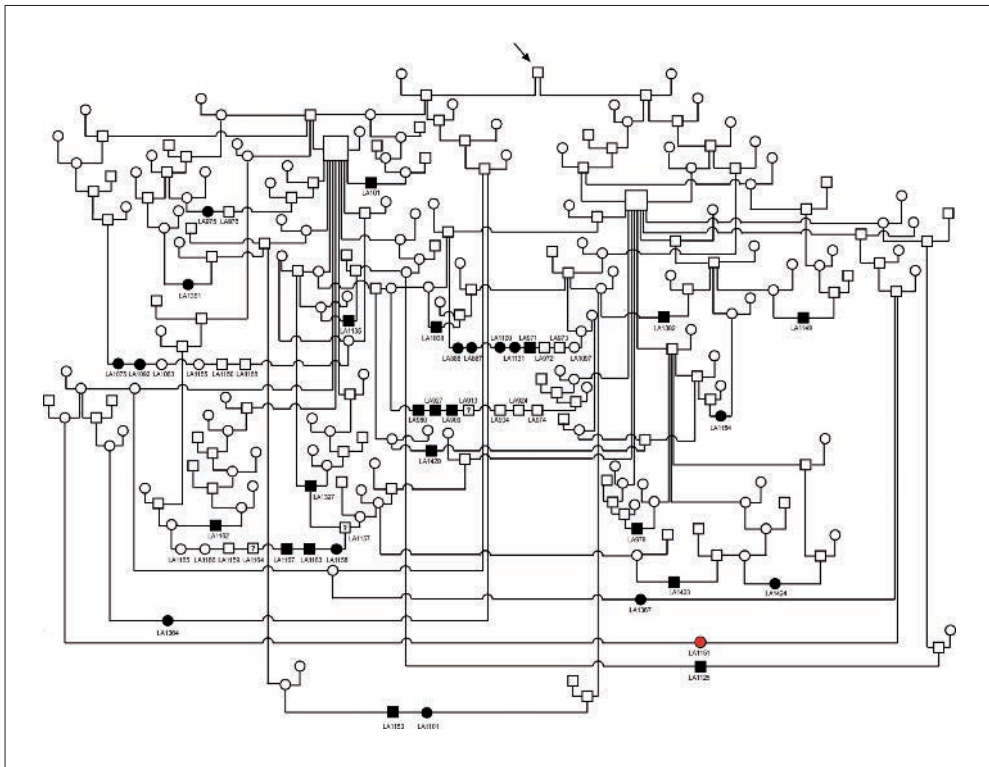


Abb. 4 Stammbaum von 33 Labrador Retrievern mit disproportioniertem Zwergwuchs (FRISCHKNECHT et al. 2013). Betroffene Hunde sind als ausgefüllte Symbole dargestellt. Ein Hund, der ebenfalls zwergwüchsig war, aber nicht die SD2-Mutation trug, ist rot dargestellt. Bei diesem Hund wird vermutet, dass er einen anderen genetischen Defekt hat, der den Zwergwuchs und eine zusätzliche Deformation einer Pfote verursacht. Dieser Stammbaum ist mit einem monogen autosomal rezessiven Erbgang vereinbar. Das mit einem Pfeil bezeichnete männliche Tier am oberen Rand der Abbildung wurde 1966 geboren und könnte das Gründertier für SD2 sein.

fugen langer Röhrenknochen. Beim Menschen sind zahlreiche Mutationen im *COL11A2*-Gen beschrieben, die zu verschiedenen relativ schwerwiegenden skeletalen Dysplasien und/oder Taubheit führen. Aufgrund der Daten von Mensch und auch *Coll1a2*-defizienten Mäusen wurde gefolgert, dass die Variante im *COL11A2*-Gen die wahrscheinlichste Ursache für SD2 beim Labrador Retriever darstellt. Der relativ milde Phänotyp bei Labrador Retrievern dürfte vermutlich dadurch zu erklären sein, dass sich der Aminosäureaustausch ganz am N-Terminus, noch vor der tripelhelikalen Domäne des Kollagenmoleküls befindet und somit nur eine geringgradige Beeinträchtigung der Proteinfunktion verursacht. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ergab, dass Labrador Retriever mit dem homozygot varianten Genotyp im Durchschnitt eine um 6 cm verminderte Schulterhöhe gegenüber heterozygoten oder homozygot freien Hunden aufwiesen (Abb. 6).

In einer Kohorte von ca. 700 Labrador Retrievern betrug die Häufigkeit von heterozygoten Anlageträgern etwa 12,2%. Durch die Forschungsarbeiten steht nun auch hier ein Gentest



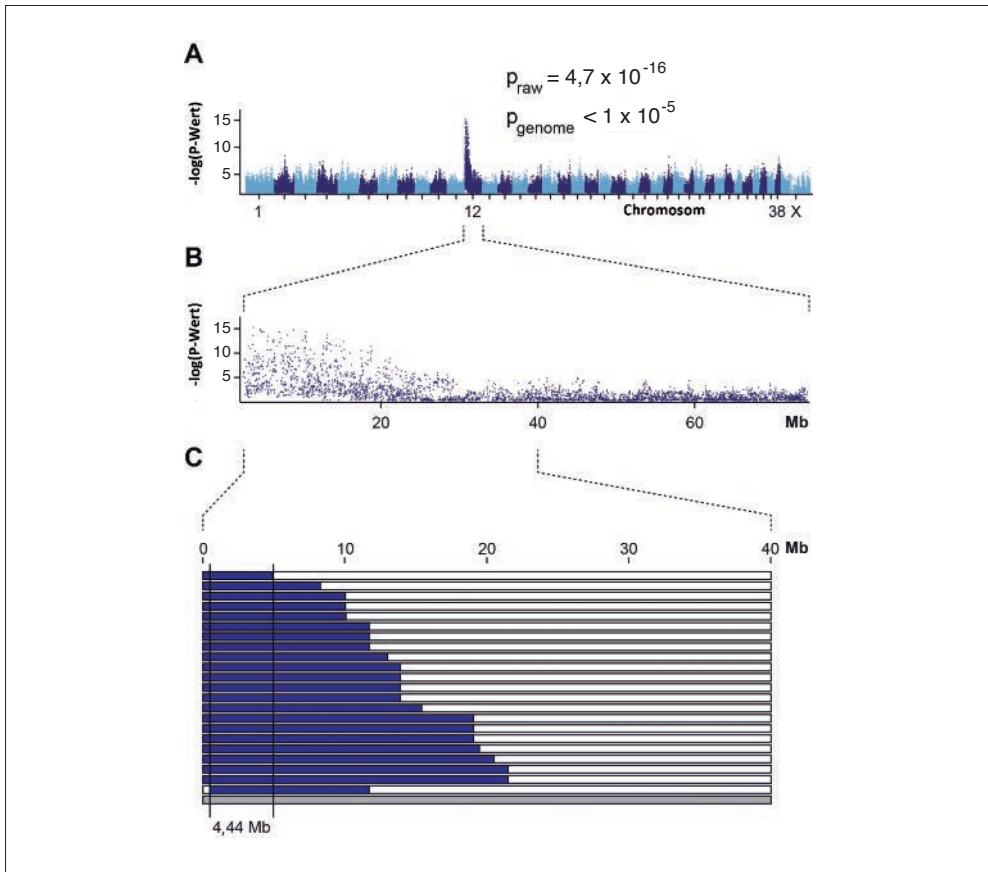


Abb. 5 Kartierung der ursächlichen Variante für SD2 in Labrador Retrievern (FRISCHKNECHT et al. 2013). (A) Eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) mit 23 Fällen und 37 Kontrollen ergab eine signifikante Assoziation von Marker auf dem Chromosom 12 mit dem Merkmal SD2. (B) Ein Vergrößerung des Chromosoms 12 zeigt ein etwa 18 Mb großes assoziiertes Intervall. (C) Homozygotiekartierung der 23 Fälle. Homozygot identische Haplotypblöcke sind blau dargestellt. Der gemeinsame Bereich bei 22 der 23 Fälle umfasst 4,44 Mb und definiert das kritische Intervall von Position 467 795 bis 4 906 914, wobei sich die Koordinaten auf das CanFam3.1-Referenzgenom beziehen. Der 23. Fall trug nicht den assoziierten Haplotyp und wurde als Phänokopie eingestuft. Es handelt sich um den rot dargestellten Hund aus dem Stammbaum in Abb. 4, welcher auch einen besonders schweren Phänotyp mit einer zusätzlichen Deformation einer Pfote aufwies.

zur Verfügung, mit dem wirksam gegen dieses Allel selektiert werden kann. Die Daten zeigen aber auch, dass Varianten im *COL11A2*-Gen nicht, wie bisher vermutet, zwangsläufig zu sehr schwergradigen Phänotypen führen müssen. Die Befunde bei den Labrador Retrievern werfen die Frage auf, ob es vielleicht Varianten im *COL11A2*-Gen gibt, die einen so geringen Einfluss auf die Struktur oder Menge des Proteins haben, dass sie nicht in einem pathologischen Phänotyp resultieren, sondern zur normalen Variation von Körpergröße und Morphologie beitragen.

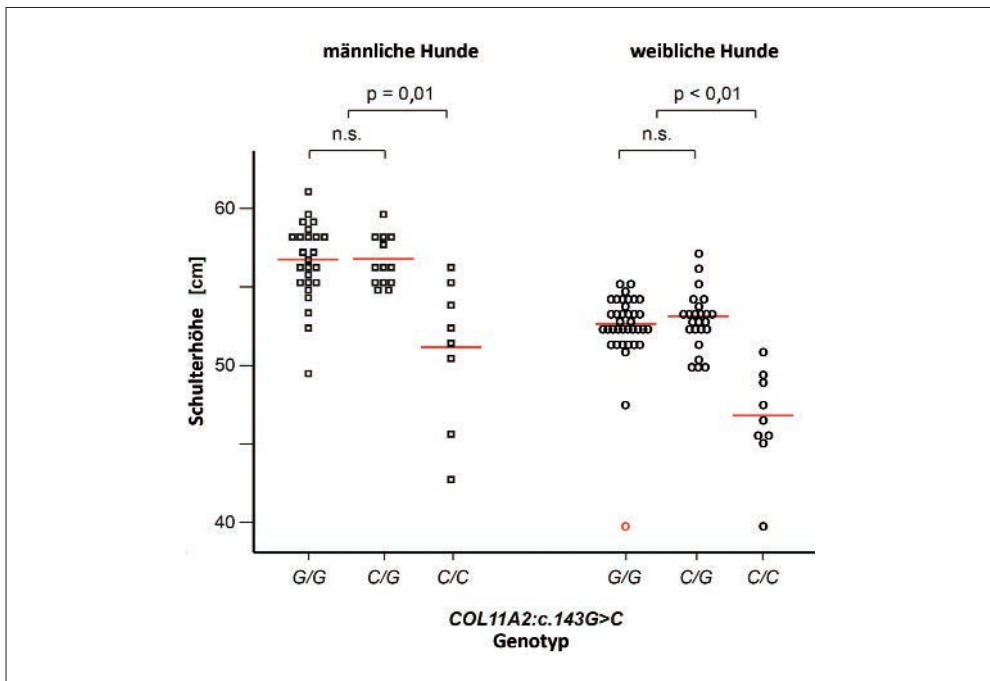


Abb. 6 Genotyp-Phänotyp-Korrelation für SD2 bei Labrador Retrievern (FRISCHKNECHT et al. 2013). Die Abb. zeigt die Schulterhöhen von männlichen und weiblichen Labrador Retrievern mit den drei unterschiedlichen Genotypen an der vermeintlich kausalen *COL11A2:c.143G>C*-Variante. Die Abb. verdeutlicht sehr schön, dass die Schulterhöhe ein quantitatives Merkmal mit einer nahezu kontinuierlichen Verteilung ist. Es ist also nicht möglich, nur anhand der Schulterhöhe einen SD2-Phänotyp zu diagnostizieren. Umgekehrt ist die Schulterhöhe von Hunden, die homozygot den varianten Genotyp tragen, signifikant und im Durchschnitt um etwa 6 cm niedriger als die Schulterhöhe in den beiden anderen Genotypklassen. Der zwergwüchsige Hund, der die ursächliche Mutation nicht trug, ist als roter Kreis dargestellt. Der gleiche Hund wurde auch in den Abb. 4 und 5 erwähnt.

#### 4. 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. Die beiden wichtigsten Technologien sind die genomweite Assoziationsstudie (GWAS) zur Kartierung der ursächlichen Varianten sowie die Gesamtgenomsequenzierung (WGS) zur Ermittlung möglichst vollständiger Listen aller vorkommenden Variationen. Die Aufklärung von Erbfehlern bei Begleittieren erlaubt einerseits ihre züchterische Bekämpfung mit Hilfe von Gentests und liefert andererseits wichtige Erkenntnisse für die biomedizinische Grundlagenforschung.

## Literatur

- ALANAY, Y., and LACHMAN, R. S.: A review of the principles of radiological assessment of skeletal dysplasias. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 3, 163–178 (2011)
- DRÖGEMÜLLER, M., JAGANNATHAN, V., HOWARD, J., BRUGGMANN, R., DRÖGEMÜLLER, C., RÜTTEN, M., LEEB, T., and KOOK, P. H.: A frameshift mutation in the cubilin gene (CUBN) in Beagles with Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective cobalamin malabsorption). *Anim. Genet.* 45/1, 148–150 (2014)
- FRISCHKNECHT, M., NIEHOF-OELLERS, H., JAGANNATHAN, V., OWCZAREK-LIPSKA, M., DRÖGEMÜLLER, C., DIETSCHI, E., DOLF, G., TELLHELM, B., LANG, J., TIIRA, K., LOHI, H., and LEEB, T.: A *COL11A2* mutation in Labrador retrievers with mild disproportionate dwarfism. *PLoS One* 8, e60149 (2013)
- GOLDSTEIN, O., GUYON, R., KUKKOVA, A., KUZNETSOVA, T. N., PEARCE-KELLING, S. E., JOHNSON, J., AGUIRRE, G. D., and ACLAND, G. M.: *COL9A2* and *COL9A3* mutations in canine autosomal recessive oculoskeletal dysplasia. *Mamm. Genome* 21, 398–408 (2010)
- GRÄSBECK, R.: Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective vitamin B (12) malabsorption with proteinuria). *Orphanet J. Rare Dis.* 1, 17 (2006)
- HE, Q., MADSEN, M., KILKENNEY, A., GREGORY, B., CHRISTENSEN, E. I., VORUM, H., HØJRUP, P., SCHÄFFER, A. A., KIRKNESS, E. F., TANNER, S. M., DE LA CHAPELLE, A., GIGER, U., MOESTRUP, S. K., and FYFE, J. C.: Amnionless function is required for cubilin brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin (vitamin B12) absorption in vivo. *Blood* 106, 1447–1453 (2005)
- 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. 3<sup>rd</sup>, 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)
- LANGO ALLEN, H., ESTRADA, K., LETTRE, G., BERNDT, S. I., WEEDON, M. N., RIVADENEIRA, F., WILLER, C. J., JACKSON, A. U., VEDANTAM, S., RAYCHAUDHURI, S., et al.: Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature* 467, 832–838 (2010)
- LEE, T.: Erbfehler bei Begleittieren. *Nova Acta Leopoldina NF Bd. 113*, Nr. 388, 183–190 (2012)
- 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)
- NIELSEN, M. J., RASMUSSEN, M. R., ANDERSEN, C. B., NEXØ, E., and MOESTRUP, S. K.: Vitamin B12 transport from food to the body's cells – a sophisticated, multistep pathway. *Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 345–354 (2012)
- OWCZAREK-LIPSKA, M., JAGANNATHAN, V., DRÖGEMÜLLER, C., LUTZ, S., GLANEMANN, B., LEEB, T., and KOOK, P. H.: A frameshift mutation in the cubilin gene (CUBN) in Border Collies with Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective cobalamin malabsorption). *PLoS One* 8, e61144 (2013)
- PARKER, H. G., VONHOLDT, B. M., QUIGNON, P., MARGULIES, E. H., SHAO, S., MOSHER, D. S., SPADY, T. C., ELKAHLOUN, A., CARGILL, M., JONES, P. G., MASLEN, C. L., ACLAND, G. M., SUTTER, N. B., KUROKI, K., BUSTAMANTE, C. D., WAYNE, R. K., and OSTRANDER, E. A.: An expressed *fgf4* retrogene is associated with breed-defining chondrodysplasia in domestic dogs. *Science* 325, 995–998 (2009)
- PENNISI, E.: The geneticist's best friend. *Science* 317, 1668–1671 (2007)
- SMT, J. J., TEMWITCHITR, J., BROCKS, B. A., NIKKELS, P. G., HAZEWINKEL, H. A., and LEEGWATER, P. A.: Evaluation of candidate genes as a cause of chondrodysplasia in Labrador retrievers. *Vet. J.* 187, 269–271 (2011)
- VISSCHER, P. M., MCEVOY, B., and YANG, J.: From Galton to GWAS: quantitative genetics of human height. *Genet. Res. (Camb.)* 92, 371–379 (2010)

Prof. Dr. Tosso LEEB  
Institut für Genetik  
Vetsuisse-Fakultät  
Universität Bern  
Bremgartenstrasse 109a  
3001 Bern  
Schweiz

Tel.: +41 31 6312326  
Fax: +41 31 6312640  
E-Mail: Tosso.Leeb@vetsuisse.unibe.ch

## Strukturelle Genomveränderungen des caninen Mammakarzinoms und deren Nachweis in zirkulierenden Nukleinsäuren

Bertram BRENIG ML<sup>1</sup>, Silvia HENNECKE,<sup>1</sup> Julia BECK,<sup>2</sup> Howard B. URNOVITZ,<sup>2</sup> Stephan NEUMANN,<sup>1</sup> und Ekkehard SCHÜTZ<sup>1,2</sup> (Göttingen)

Mit 3 Abbildungen und 1 Tabelle

### Zusammenfassung

Strukturelle und numerische chromosomale Aberrationen wurden bei fünf caninen Mammatumoren mittels „next generation sequencing“ untersucht. Dabei konnten umfangreiche und sehr heterogene tumor-spezifische Veränderungen der DNA nachgewiesen werden. Die tumor-spezifischen DNA-Signaturen konnten außerdem in der zirkulierenden DNA (cfDNA) der Patientinnen detektiert werden. Eine chromosomale Deletion auf Chromosom 27 konnte in ca. 60 % aller Mammatumoren identifiziert werden und enthielt das Tumorsuppressor-Gen *PFDN5* (Prefoldin-Subunit 5).

Zur Untersuchung des postoperativen Verlaufs wurde ein tumor-spezifischer DNA-basierter Nachweis bei einer Hündin entwickelt. Das entsprechende Amplifikat wurde vor der Operation und in zwei weiteren Blutproben, die 83 und 89 Wochen nach der Operation entnommen wurden, nachgewiesen. Der postoperative Nachweis des Amplifikats deutete auf eine bereits erfolgte Metastasierung hin, die durch eine Computertomographie bestätigt werden konnte.

Der Nachweis tumor-spezifischer DNA-Signaturen in zellfreier zirkulierender DNA (cfDNA) im Serum von Patienten eröffnet neue Möglichkeiten einer nicht-invasiven klinischen Tumordiagnostik.

### Abstract

Structural and copy number variations of chromosomes were analysed in five canine mammary tumours by next generation sequencing. A plethora of relatively heterogenous aberrations were identified. The tumour-specific DNA signatures were also detectable in cell-free circulating nucleic acids (cfDNA). One chromosomal deletion on chromosome 27 harbouring the tumour-suppressor gene *PFDN5* (prefoldin subunit 5) was detected in approximately 60 % of all tumours.

To analyse the postoperative development, a tumour-specific DNA-based assay was designed for one patient. The specific amplicon was detected before and in two further blood samples taken 83 and 89 weeks after surgery. The postoperative presence of the specific amplicon indicated that the tumour had already metastasised. This was confirmed by computed tomography.

The detection of tumour-specific DNA signatures in cell-free circulating DNA in the serum of patients opens new possibilities in non-invasive clinical tumour diagnostics.

## 1. Einleitung

Gesäugetumoren sind mit etwa 50 % die häufigste Neoplasie beim weiblichen Hund, die in ca. 60 % der Fälle bösartig sind. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Adenokarzinome bzw. Karzinome. In der Kleintierklinik des Tierärztlichen Instituts liegt die Häufigkeit von Mammatumoren bezogen auf die Patientenzahl ( $n = 9265$  in 3 Jahren) bei 0,98 %.

1 Tierärztliches Institut, Georg-August-Universität Göttingen.

2 Chronix Biomedical GmbH, Göttingen.

Die Genomanalyse von Tumoren mittels Sequenzierung gewinnt für die onkologische Forschung zunehmend an Bedeutung. Hierbei stehen die Untersuchung tumorbiologischer Grundlagen und die Entwicklung individueller prognostischer Marker im Vordergrund. Die Untersuchung caniner Tumorgenome im Vergleich zu humanen Tumoren kann besonders zur Aufdeckung allgemeiner Tumorentstehungsmechanismen beitragen.

Kennzeichnend für die Mehrzahl maligner Zellen sind strukturelle Variationen (SV), z. B. große Duplikationen, Deletionen oder Translokationen. Mit der Charakterisierung von chromosomalen Bereichen, die in bestimmten Karzinomen häufig strukturelle Variationen aufweisen, könnten in Zukunft auch diagnostische Biomarker zur Unterscheidung von benignen und malignen Tumoren entwickelt werden. Zirkulierende Nukleinsäuren (CNA), die aus dem Blutserum/-plasma extrahiert werden, können hier als nicht-invasive diagnostische Biomarker dienen. CNA finden sich im Blut von gesunden und kranken Individuen und stammen im Wesentlichen aus apoptotischen Zellen des Körpers. Chromosomenveränderungen aus apoptotischen Karzinomzellen sind im Blut nachweisbar.

In der vorliegenden Studie wurde die DNA von fünf malignen Tumoren mittels Mate-Pair-Sequenzierung auf strukturelle Variationen untersucht. Mit dieser Technik werden kurze Randsequenzen von 1–3 kb großen Fragmenten genomischer DNA generiert. Durch die Positionierung der Randsequenzpaare auf dem Referenzgenom können strukturelle Variationen des untersuchten Genoms identifiziert werden. Des Weiteren erfolgt die Auswertung der Sequenzdaten durch die Analyse der erzeugten Sequenzabdeckung, eine höhere Anzahl von erzeugten Sequenzen eines chromosomalen Abschnitts in der Tumorprobe im Vergleich zu einer genomischen Kontrollprobe spricht dabei für eine Amplifikation, eine geringere Abdeckung für eine Deletion.

## 2. Material und Methoden

Die Blut- und Gewebeproben stammten von fünf Hündinnen verschiedener Rassen, bei denen eine Mastektomie durchgeführt wurde. Histologisch wurden vier Tumoren als Adenokarzinom und einer als Osteosarkom klassifiziert. Aus dem homogenisierten Tumorgewebe und den Leukozyten des jeweiligen Tieres wurde die genomische DNA extrahiert. Außerdem wurde die zirkulierende DNA aus 0,5 ml Plasma mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Roche Applied Science) extrahiert.

Die Leukozyten- und die Tumor-DNA wurden per Ultraschall auf eine Länge von ca. 3 kb fragmentiert und nach dem „Mate-Paired Library Preparation“-Protokoll für die *Next-Generation*-Sequenzierung im SOLiD 4+ (Life Technologies) bearbeitet. Die Kartierung der erhaltenen Fragmente erfolgte mit Hilfe des Programms Bioscope (Version 1.2) auf dem caninen Referenzgenom (build 2.1, NCBI).

Die Analyse der Abdeckungstiefe erfolgte mittels des R-Paket *cnv-seq* (XIE und TAMMI 2009). Mit Hilfe des Programms SVDetect (ZEITOUNI et al. 2010) wurden aus den abnormal kartierten Sequenzpaaren putative strukturelle Variationen des Tumors identifiziert und auf Auftreten in der Leukozyten-DNA des gleichen Tieres überprüft. Strukturelle Variationen, für die ein gleichartiges abnormal kartiertes Sequenzpaar innerhalb eines 3 kb-Fensters in der Leukozyten-DNA detektiert wurde, wurden eliminiert. In einem zweiten Schritt wurden alle putativen Tumor-SV gegen die Leukozyten-DNA aller Tiere gefiltert. Es wurden 83 strukturelle Variationen per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft.

Zur Validierung einer Deletion des *PFDN5*-Genlocus (Cfa27:4.910.008-4.913.488) wurde eine digitale *Real-time*-PCR entwickelt. Primer und entsprechende Hydrolyse-Sonden wurden innerhalb des *PFDN5*-Locus und für den in allen Tumoren als diploid gefundenem *FGF5*-Locus (Kontrollamplicon, Cfa32:7.473.035-7.492.885) konstruiert. Die DNA von 10 Tumor- und Leukozytenproben wurde in einer Konzentration von 0.5 haploiden Genomäquivalenten (ca. 1.65 pg) pro Reaktion eingesetzt. Die digitale PCR wurde in 192 Reaktionen (5  $\mu$ l) in einem LightCycler480 durchgeführt.

Für eine im Tumor von Tier 49 aufgetretene Fusion von Cfa27 und Cfa35 wurde in gleicher Weise eine digitale PCR durchgeführt; als Kontrolle diente hier ebenfalls das *FGF5*-Amplicon. Untersucht wurden die Leukozyten-DNA, Tumor-DNA und CNA aus einer am Operationstag entnommenen Plasmaprobe sowie CNA aus Plasma, das 83 und 89 Wochen postoperativ entnommen wurde.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die fünf untersuchten Tumoren stellen sich in ihrer genomischen Strukturvarianz als heterogen dar. Bei Tumor 49 gab es auf den Chromosomen 11, 20, 27 und 35 markante Abweichungen. Deletionen bzw. Amplifikationen ganzer Chromosomen konnten bei Tumor 30 und 47 beobachtet werden. Größere Abschnitte der Chromosomen 6 und 21 waren bei Tumor 30 deletiert. Bei Tumor 52 fanden sich u. a. auf Chromosom 18 und auf Chromosom 10 Veränderungen in der Kopienanzahl. Das Genom des Tumors 35 zeigt nur vereinzelte kleinere Deletionen und weist insgesamt die wenigsten Variationen auf.

Eine Deletion des *PFDN5*-Genlocus konnte mit Hilfe der Sequenzierung bei drei der fünf untersuchten Tumorgenome detektiert und mittels eines digitalen PCR-Assays bestätigt werden. Außerdem wurde die *PFDN5*-Deletion auch in drei weiteren von insgesamt fünf zusätzlich untersuchten Tumorproben und somit in insgesamt 60 % nachgewiesen. *PFDN5* (auch c-Myc-Modulator 1 (MM1)) ist ein potentieller Tumorsuppressor, der die Expression von c-Myc unterdrückt (FUJIOKA et al. 2001). Anhand der weiterhin durchgeführten Analyse der anormal kartierten Endsequenzpaare konnten die in Tabelle 1 dargestellten strukturellen Variationen der Tumorgenome detektiert werden. Wie auch die Analyse der Abdeckungstiefe zeigen diese Ergebnisse, dass Tumorgenome starke strukturelle Heterogenität aufweisen.

Tab. 1 Genomveränderungen nach Filterung gegen fünf Leukozyten-Kontrollgenome

	T49	T47	T30	T52	T35
Gesamt	40	8	35	2	0
Duplikation	2	0	3	0	0
Insertion	3	2	2	1	0
Deletion	8	0	23	0	0
Translokation	15	5	1	1	0
Inversion	12	1	6	0	0

Die strukturellen Variationen des Tumors 49 stellen sich als besonders komplex heraus. In Abbildung 1 sind die beiden Chromosomen (Cfa27 und Cfa35) als CIRCOS-Graph dargestellt. Im äußeren Ring ist das Verhältnis der Abdeckungstiefe von Tumor- zu Leukozytenprobe dargestellt. Beide Chromosomen weisen Bereiche mit multiplizierter Kopienzahl auf. Die ver-

bindenden Linien im Inneren des Graphen zeigen die Positionen von Sequenzpaaren, die verschiedene Fusionsstellen zwischen den beiden Chromosomen überspannen. Mittels einer digitalen PCR, mit für eine Fusionsstelle spezifischen Primern, konnte die DNA des Tumors auch in der CNA des entsprechenden Tieres nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kopien des Kontrollamplicons konnten in der präoperativ entnommenen Plasmaprobe 10 % des fusionierten Cfa27:Cfa35-Chromosoms nachgewiesen werden (Abb. 2).

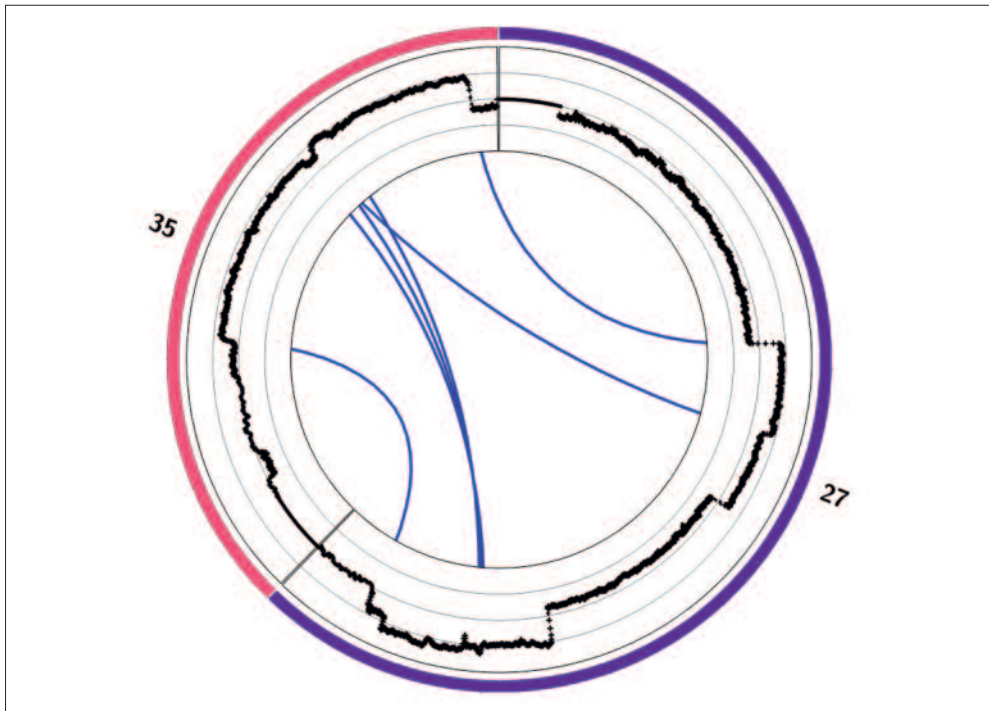


Abb. 1 CIRCOS<sup>2</sup>-Graph der strukturellen Veränderungen von Cfa27-Cfa35 bei Hündin 49

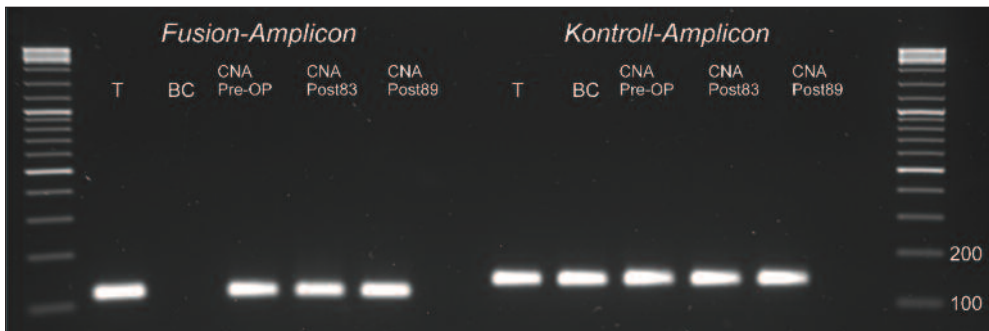


Abb. 2 Nachweis eines tumorspezifischen Fusionsfragments in zellfreier zirkulierender DNA (cfDNA) der Hündin 49. Die Abbildung zeigt die Auftrennung des tumorspezifischen Fusionsfragments (*linke Seite*) und eines Kontrollfragments (*rechte Seite*) in einem 2%igen Agarosegel. Die cfDNA-Isolierung erfolgte aus Tumor 49 (T), „buffy coat“ (Leukozyten, BC), vor der Operation (CNA Pre-OP) sowie 83 bzw. 89 Wochen nach der Operation (CNA Post83/Post89). Die Größen der DNA-Fragmente sind in Basenpaaren angegeben (100, 200).



Die untersuchten Plasmaproben, die 83 und 89 Wochen nach der Mastektomie entnommen wurden, zeigten im gleichen Assay noch 4,9 % bzw. 4,3 % des fusionierten Chromosoms. Die immer noch nachweisbare Fusion ließ auf das Vorliegen einer Metastase des Tumors schließen. Bei einer daher durchgeführten computertomographischen Untersuchung dieses Tieres wurden ein vergrößerter regionaler Lymphknoten und verdächtige Bereiche im Lungenparenchym festgestellt (Abb. 3). Diese klinischen Befunde werden, wie auch die strukturellen Veränderungen in der CNA, weiter beobachtet.

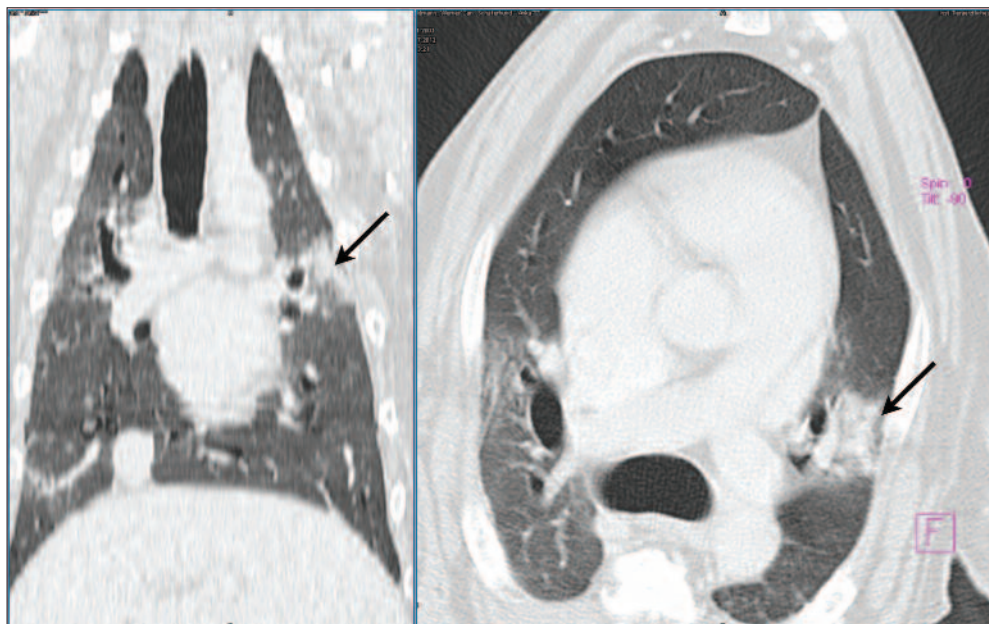


Abb. 3 Nachweis einer thorakalen Metastase bei Hündin 49 mittels Computertomographie. Die Abbildung zeigt den Thorax der Hündin 49 in zwei Ebenen. Die Pfeile markieren die Lage der Metastase im Lungenparenchym.

Zusammenfassend konnten bei den untersuchten malignen Mammatumoren strukturelle Genomaberrationen nachgewiesen werden, deren Korrelat im Plasma als Tumorbiomarker anwendbar erscheint (BECK et al. 2013).

#### *Dank*

Die Autoren danken Sarah BIERAU, Stefan BALZER und Melanie SCHARFENSTEIN für die exzellente technische Unterstützung.

#### *Literatur*

BECK, J., HENNECKE, S., BORNEMANN-KOLATZKI, K., URNOVITZ, H. B., NEUMANN, S., STRÖBEL, P., KAUP, F. J., BREINIG, B., and SCHÜTZ, E.: Genome aberrations in canine mammary carcinomas and their detection in cell-free plasma DNA. *PLoS One* 8:e75485. doi: 10.1371/journal.pone.0075485 (2013)



*B. Brenig, S. Hennecke, J. Beck, H. B. Urnovitz, S. Neumann und E. Schütz*

- FUJIOKA, Y., TAIRA, T., MAEDA, Y., TANAKA, S., NISHIHARA, H., IGUCHI-ARIGA, S. M. M., NAGASHIMA, K., and ARIGA, H.: MM-1, a c-Myc-binding protein, is a candidate for a tumor suppressor in leukemia/leukoma and tongue cancer. *J. Biol. Chem.* 276, 45137–45144 (2001)
- XIE, C., and TAMMI, M.: CNV-seq, a new method to detect copy number variation using high-throughput sequencing. *BMC Bioinformatics* 10/80, doi: 10.1186/1471-2105-10-80 (2009)
- ZEITOUNI, B., BOEVA, V., JANOUÉIX-LEROSEY, I., LOEILLET, S., LEGOIX-NÉ, P., NICOLAS, A., DELATTRE, O., and BARILLOT, E.: SVDetect: a tool to identify genomic variations from paired-end and mate-pair sequencing data. *Bioinformatics* 26, 1895–1896 (2010)

Prof. Dr. Bertram BREINIG  
Tierärztliches Institut  
Burckhardtweg 2  
37077 Göttingen  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 551 3933380  
Fax: +49 551 3933381  
E-Mail: [bbrenig@gwdg.de](mailto:bbrenig@gwdg.de)

Dr. Julia BECK  
Chronix Biomedical GmbH  
Goetheallee 8  
37073 Göttingen  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel: +49 551 37075722  
Fax: +49 551 37075726  
E-Mail: [info@chronix-bio-medical.de](mailto:info@chronix-bio-medical.de)

## Die Genetik der Gesäugequalität beim Schwein

Klaus WIMMERS (Dummerstorf)

Mit 3 Abbildungen

### *Zusammenfassung*

Inbesondere bei steigender Wurfgröße ist die Ausbildung eines symmetrischen Gesäuges mit mindestens 14 funktionellen Zitzen ein wesentlicher Faktor für eine gute Aufzuchtleistung von Sauen und geringe Ferkelsterblichkeit. Die Anzahl Zitzen ist ein moderat heritables Merkmal, für das auf fast allen Chromosomen des Schweines QTL-Regionen gezeigt wurden. Die QTL haben Effekte, die 0,5 bis 1,5 Zitzen entsprechen. Dabei wurden erwünschte QTL-Allele in den verschiedenen parental Populationen der in Kopplungsanalysen genutzten experimentellen Kreuzungen gefunden. Die häufigste Gesäugeanomalie stellen die Stülpzitzen dar, die zu einer Reduktion der Anzahl funktioneller Zitzen führt. Auch für die Anfälligkeit zur Ausprägung von Stülpzitzen wurden in einer experimentellen Kreuzungspopulation eine Reihe von QTL identifiziert, von denen QTL auf den Chromosomen 3, 4, 6 und 11 auch in kommerziellen Mutterlinien gefunden wurden. Die vergleichende Analyse des Transkriptom von mesenchyalem und epithelalem Gewebe von Stülpzitzen und gesunden Zitzen mit genomweiten sowie applikationspezifischen Mikroarrays weist auf differenzielle Expression in Signalwegen der mesenchymal-epithelialen Kommunikation sowie Reaktionswegen des Zellwachstums, der Zelladhäsion und Zellkommunikation hin. Untersuchungen von fetalen Geweben unterstreichen, dass schon während der pränatalen Entwicklung die Morphologie und Funktion des Gesäuges, einschließlich der Ausprägung von Stülpzitzen, angelegt wird. Die Signalkaskaden von Wachstumsfaktoren spielen dabei eine wichtige Rolle, und Assoziationen einer Reihe von Genen in diesem Reaktionsweg konnten gezeigt werden.

### *Abstract*

In pig breeding litter size is an important characteristic of efficiency. The mothering ability of the sow, which is related to the number of functional teats, plays an important role to warrant low piglet mortality. Teat number is a moderately heritable trait, and QTL were detected on most swine chromosomes. Typically, the QTL explain differences of 0.5 to 1.5 in teat number. Desirable alleles segregate among different parental populations that were used in the linkage studies. The inverted teat defect is the most important disorder of the mammary complex in pigs. A number of QTL for the liability to emerge inverted teats were detected in an experimental crossbreeding population and QTL on chromosomes 3, 4, 6 and 11 were confirmed in commercial lines. Comparative expression studies using the whole-genome catalogue as well as application-specific microarrays of epithelial and mesenchymal tissues of normal and inverted teats revealed differential expression of genes related to 'cell maintenance, proliferation, differentiation and replacement', 'organismal, organ and tissue development' and 'cell-to-cell signaling and interaction'. The differential expression at fetal stages likely reflects the prenatal initiation of postnatal phenotypes concerning the number and shape as well as functionality of teats. In particular genes encoding members of canonical pathways of growth factor signaling were highlighted, and associations with emergence of inverted teats were shown.

### **1. Einleitung**

Die Anzahl abgesetzter Ferkel ist in der Sauenhaltung entscheidend für das betriebswirtschaftliche Ergebnis. In den letzten Jahren konnte die Anzahl lebend geborener Ferkel pro Sau kontinuierlich erhöht werden. Auch die Aufzuchtleistung der Muttertiere muss entsprechend

gesteigert werden, wofür neben der Homogenität der Würfe, der Geburtsgewichte und der Mütterlichkeit, die Milchmenge und die Qualität der Gesäuge hinsichtlich Form und die Anzahl funktioneller Zitzen wichtig ist, damit erhöhte Ferkelzahlen nicht mit steigenden Verlusten einhergehen.

Die Milchdrüse (*Mamma*) ist eine modifizierte apokrine Hautzelle. Diese verzweigte, tubuloalveoläre Drüse versorgt Neugeborene mit Nährstoffen und spielt außerdem für die passive Immunisierung über die Kolostralmilch in den ersten Stunden nach der Geburt eine wichtige Rolle. Die Entwicklung der Milchdrüse besteht aus der *Mammogenese* (Entwicklung des Drüsenkomplexes), der *Laktogenese* oder der *Galaktogenese* (Einsetzen der Laktation), der *Galaktopoese* (Aufrechterhaltung der Laktation), der *Galaktokinese* (Ausschüttung der Milch) und der *Involution* (Rückbildung der Milchdrüse) am Ende der Laktation. Diese Differenzierungs-, Proliferations- und Involutionsprozesse der Milchdrüse finden entlang der Ontogenese während der pränatalen, juvenilen präpubertären und pubertären Entwicklung einmalig und während der Gravidität und Laktation wiederholt statt.

Auf Merkmale der Gesäugemorphologie wird bei Mutterlinien konsequent selektiert; symmetrische Gesäuge mit mindestens 14 funktionellen Zitzen werden in Mutterlinien gefordert. Für das Merkmal Anzahl Zitzen wurden Heritabilitäten zwischen 0,1 und 0,5 geschätzt sowie eine Reihe von QTL identifiziert.

„Quantitative Trait Loci“ (QTL) für die Anzahl funktioneller und nicht-funktioneller Zitzen.

Die QTL-Datenbank (PigQTLdb, HU et al. 2013) weist 84 QTL für das Merkmal Zitzenanzahl aus, die über alle Chromosomen (SSC) des Schweins außer SSC 9, 13, 14 und 18 verteilt vorkommen. Die additiven Effekte der QTL bedeuten, dass die verschiedenen homozygoten Träger der QTL-Allele eine um etwa 0,5 bis 1,5 unterschiedliche Anzahl an Zitzen aufweisen. Dabei fällt auf, dass in den unterschiedlichen experimentellen Kreuzungspopulationen, die in den Kopplungsanalysen eingesetzt wurden, die erwünschten Allele der diversen QTL von verschiedenen parental Rassen vererbt werden. In den experimentellen Kreuzungen der Universität Hohenheim (Wildschwein × Pietrain, Wildschwein × Meishan, Meishan × Pietrain) z. B. wurden QTL-Allele mit erwünschtem Effekt sowohl aus der Meishan- als auch der Wildschweinpopulation gefunden (BEECKMANN et al. 2003, DRAGOS-WENDRICH et al. 2003, YUE et al. 2003). Auch in anderen experimentellen Kartierungspopulationen haben die asiatischen Rassen Meishan und Erhualian sowohl positive als auch negative Allele beigetragen (BIDANEL et al. 2008, DING et al. 2009, GUO et al. 2008, HIROOKA et al. 2001, SATO et al. 2006, WADA et al. 2000, ZHANG et al. 2007). Neben der Tatsache, dass offensichtlich eine Vielzahl von Genen an der Ausprägung des Merkmals Zitzenzahl beteiligt ist, zeigen die Beiträge erwünschter und unerwünschter Allele aus modernen europäischen Rassen, traditionellen asiatischen Rassen und dem Wildschwein, dass eine große genetische Variabilität existiert, die ein großes Potential für züchterische Verbesserung eröffnet.

Neben der Gesamtzahl an Zitzen ist die Anzahl an funktionellen Zitzen bzw. die Anzahl oder das Auftreten von nicht-funktionellen Zitzen für die Aufzuchtleistung der Muttertiere wichtig. Gegen das Auftreten von nicht-funktionellen Zitzen wird daher in Mutterlinien konsequent selektiert. Dabei stellen sogenannte Stülpzitzen die häufigste Form der nicht-funktionellen Zitzen dar. Es handelt sich dabei um eine Gesäugeanomalie, bei der der Zitzenkörper, insbesondere die Zitzenkuppe, fehlt oder unvollständig entwickelt ist. Diese erblich bedingte Inversion der Zitzenkuppe führt in der Laktation zu einem erschwerten Milchabfluss. Stülpzitzen können nicht besäugt werden und führen so zu reduzierter Aufzuchtleistung. In ver-

schiedenen kommerziellen Schweinepopulationen findet man den Stülpzitzendefekt mit relativen Häufigkeiten zwischen 3 und 30 % (MAYER und PIRCHNER 1995, BREVERN et al. 1994, NIGGEMEYER 1993, HITTEL 1984, BLENDL et al. 1980, CLAYTON et al. 1981). In eigenen Erhebungen wurden bei Tieren der Mutterlinien Deutsche Landrasse und Deutsches Edelschwein und deren Kreuzung in den Jahren 2003–2005 Inzidenzen zwischen 10 und 14 % gefunden. In einer schwedischen Studie geben CHALKIAS et al. (2013) bei Edelschweinen (Yorkshire) für 2012 13 % betroffene Tiere an.

Die Ausprägung der Stülpzitze ist polygen bedingt. Die Heritabilität für Stülpzitzen wird zwischen 0,2 und 0,5 geschätzt (MAYER und PIRCHNER 1995). Der quantitative Charakter des Merkmals „Stülpzitze“ bezieht sich sowohl auf die Anzahl betroffener Zitzen als auch auf den Grad der Ausprägung dieser Gesäugeanomalie (MAYER und PIRCHNER 1995).

Erkenntnisse zu genetischen Grundlagen der Prädisposition zur Ausprägung von Stülpzitzen entstammen Kopplungsanalysen in einer experimentellen F<sub>2</sub>-Population, beruhend auf Berliner Miniaturschwein und Duroc. Die Untersuchungen zeigten QTL-Regionen mit genomweiter Signifikanz ( $p < 0,01$ ) auf den Chromosomen 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12 und 14 (ÜN 2002, OLTMANN 2003). Diese Ergebnisse wurden validiert und die QTL auf den Chromosomen 3, 4, 6 und 11 konnten in kommerziellen Mutterlinien bestätigt werden (JONAS et al. 2008).

## **2. Holistische Expressionsanalysen**

Der Entstehung von Stülpzitzen liegt eine Störung der Ausbildung von bindegewebigen und epithelialen Anteilen der Zitzen während der pränatalen, prä- und postpuberalen Entwicklung zugrunde. Die erste Anlage der Milchdrüse stellt die Milchlinie dar, die beim Schwein etwa am 23. Embryonaltag auftritt und sich zur Milchleiste weiterentwickelt. Aus letzterer gehen etwa am 28. Tag die Milchhügel hervor (WILLHAM und WHATLEY 1963). Im Laufe der Embryonalentwicklung kommt es anschließend zur Proliferation der Milchhügel-epithelzellen, die kolbenartig in die Tiefe wachsen und die Mammarknospe bilden. Diese wird durch Wucherung des umliegenden Mesenchymgewebes angehoben (GÜNTHER 1984).

Die Entwicklung des Gesäuges ist mit der Geburt nicht abgeschlossen, sondern setzt sich über die Stadien der Pubertät, der Gravidität und der ersten Laktation beim weiblichen Tier fort. Beim männlichen Tier bleibt der juvenile Zustand erhalten. Auch die Entwicklung der Zitzen setzt sich bis zur Geschlechtsreife fort, was durch die Beobachtung gestützt wird, dass bei Jungtieren angelegte Stülpzitzen nach dem ersten Östrus und der Gravidität einen Wachstumsschub erfahren, bei dem die Tiefe der Einstülpung deutlich zurückgeht (MATZKE 1980, STEFFENS 1993). Eine vollständige Normalisierung der Zitze ist aber nicht möglich (MATZKE 1980).

Die Entwicklung der Milchdrüse wird durch eine Reihe von Hormonen reguliert. Insbesondere der Einfluss der Geschlechtshormone (Östrogene, Gestagene, Androgene, Prolaktin) und der Stoffwechsellormone (Kortikoide, Insulin, Thyroxin, Wachstumshormon) auf die Entwicklung der Milchdrüse ist etabliert und wurde bei verschiedenen Tierarten experimentell nachgewiesen (OKA et al. 1991, GÜNTHER 1984). Experimentell konnten durch Östrogen- und Androgen-Applikation Zitzenanomalien ausgelöst werden (TATE-OSTROFF 1988). Die Entstehung von Stülpzitzen beruht auf einer unzureichenden Proliferation des Mesenchymgewebes im Bereich der Zitzenbasis zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung, so dass die Mam-

marknospe nicht über das Niveau des angrenzenden Epithelgewebes angehoben wird (GÜNTHER 1984).

Die molekularen Grundlagen der Insuffizienz der Differenzierungs-, Proliferations- und Gewebe-/Zell-Kommunikationsprozesse sind nicht geklärt. In eigenen Untersuchungen wurden, um für die Anfälligkeit zur Ausprägung von Stülpzitzen ätiologisch bedeutende molekulare Pfade und Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, positionelle und funktionelle Kandidatengene beleuchtet sowie holistische Expressionsanalysen merkmalsdivergenter Tiere zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten durchgeführt.

Vergleichende Expressionsanalysen wurden von pränatalem sowie peripubertalem Zitzenewebe vorgenommen. Um der Hypothese nachzugehen, dass eine Balance von pränatalen Proliferations- und Differenzierungsprozessen im mesenchymalen und epithelialen Zitzengewebe für die postnatale Ausprägung und Funktion des Gesäuges und der Zitzen wichtig ist, wurden Gewebeproben von Tag 63- und Tag 91-Feten untersucht. Da den pränatalen Gewebeproben kein Phänotyp hinsichtlich der Ausprägung von Stülpzitzen zugeordnet werden kann, wurden Nekropsien von Feten der Mutterrasse Deutsche Landrasse (GL) und der Vaterasse Pietrain (PI) verglichen; bei Pietrain treten nicht-funktionelle Zitzen bei bis zu 48 % der Tiere auf (TETZLAFF et al. 2009). Diese Analysen wurden mit Mikroarrays (Affymetrix GeneChips) durchgeführt. Es wurden mehr als 11 000 exprimierte Gene in den fetalen Geweben gefunden. Vergleiche wurden zu den beiden Zeitpunkten zwischen den Rassen sowie zwischen den Entwicklungsstadien innerhalb der Rassen durchgeführt. Weiter wurden die Gene betrachtet, die für die temporären Änderungen im Expressionsprofil für die eine oder andere Rasse spezifisch waren (Abb. 1) (CHOMWISARUTKUN et al. 2012a).

Die bioinformatische Analyse zeigte, dass Transkripte von Genen unterschiedliche Abundanzen aufwiesen, die den *Ingenuity*-Biofunktionen ‚cell maintenance, proliferation, differentiation and replacement‘, ‚organismal, organ and tissue development‘ und ‚genetic information and nucleic acid processing‘ zuzuordnen sind. Die Transkripte gehören nahezu ausschließlich kanonischen Pfaden der Signaltransduktion, nicht aber des Metabolismus an. Die Akkumulation von Transkripten, die in GL im Vergleich zu PI hochreguliert sind, zeigen eine höhere Proliferationsaktivität in GL an, während Prozesse der Differenzierung, Reifung und Instandhaltung der Zellen in PI prominent sind. Differenzielle Expression wurde durch quantitative RT-PCR von fünf Genen (GAB1, MAPK9, PIK3C2B, PIK3C3 und PRKCH), die in mehreren relevanten Signalwegen beteiligt sind, validiert. Die auf der Ebene des Transkriptoms gezeigten Unterschiede in der Zitzenentwicklung der beiden Rassen deuten auf die pränatale Initiierung von postnatalen Unterschieden im Zitzenphänotyp, einschließlich des Auftretens von Stülpzitzen, zwischen den Rassen (CHOMWISARUTKUN et al. 2012a).

In den weiteren Untersuchungen wurden unter Verwendung von genomweiten kommerziellen Mikroarrays (Affymetrix GeneChip Porcine Genome Array) sowie applikationsspezifischen Mikroarrays, die zusätzlich 1525 Gene aus den zuvor detektierten QTL-Regionen repräsentieren, Expressionsprofile in epithelialen und mesenchymalen Gewebeanteilen bei ad-spektorisch und palpatorisch als „normal“ bzw. „eingestülpt“ zu kategorisierenden Zitzen peripubertaler Tiere erstellt (CHOMWISARUTKUN et al. 2012b, 2013). Dazu wurden fünf diskordante Geschwisterpaare der Rasse Deutsche Landrasse ausgewählt. Aus mikroskopisch präparierten epithelialen und bindegewebigen Anteilen vom Zitzengrund von normal ausgebildeten Zitzen nicht-betroffener Tiere (*normal, non-affected*, ‚NN‘), normal ausgebildeten Zitzen betroffener Tiere (*normal teat, affected*, ‚NA‘) und eingestülpten Zitzen betroffener Tiere (*inverted, affected*, ‚IA‘) wurde RNA isoliert und für die Mikroarray-Hybridisierung markiert. Es wurden

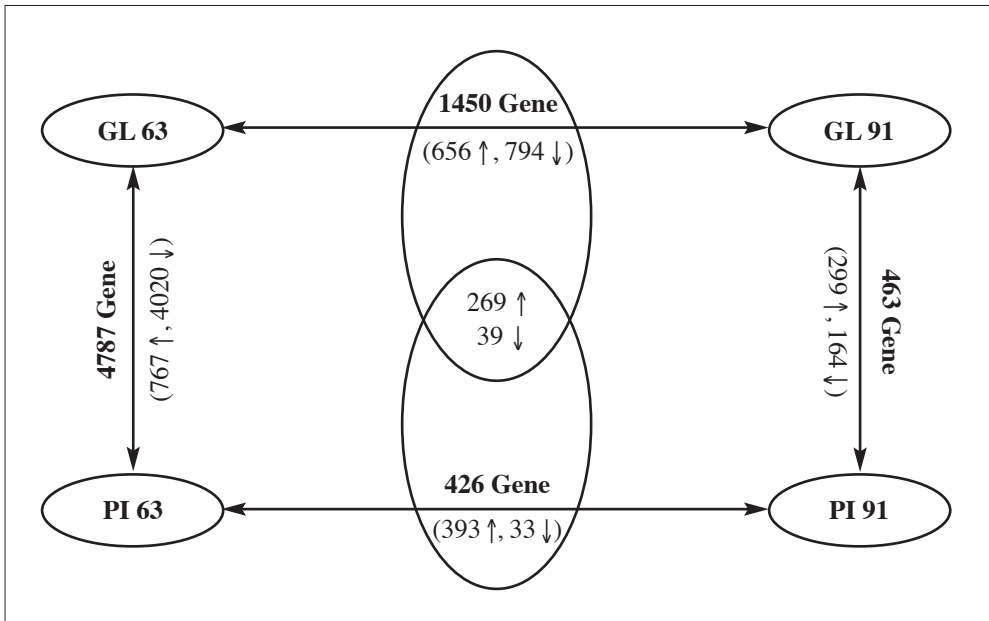


Abb. 1 Schema der Vergleiche zwischen Proben von Tag 63- und Tag 91-Feten der Rassen Deutsche Landrasse (GL) und Pietrain (PI) mit Angabe der Anzahl differenziell exprimierter Gene

also Vergleiche aufgrund des Zitzenphänotypes sowie des Affektionsstatus der Tiere unternommen (Abb. 2) (CHOMWISARUTKUN et al. 2012b, 2013).

Mit den Katalog-Arrays wurden mehrere hundert differenziell exprimierte Gene gefunden. Die applikationsspezifischen Mikroarrays lieferten 62 und 24 differenziell exprimierte Gene in epithelialen bzw. mesenchymalen Geweben. Die vergleichende Analyse des Transkriptom von mesenchyalem und epitheliale Gewebe von Stülpzitzen und gesunden Zitzen mit genomweiten und applikationsspezifischen Mikroarrays weist dabei auf differenzielle Expression in Signalwegen der mesenchymal-epithelialen Kommunikation sowie Reaktionswegen des Zellwachstums, der Zelladhäsion und Zellkommunikation hin. Die differenzielle Expression war stärker ausgeprägt in epithelialen als in mesenchymalen Geweben, und die Vergleiche zwischen den drei Kategorien von Zitzen zeigte, dass lokale Prozesse an den Stellen der Ausprägung des Defektes sowie Prozesse, die sich auf der Ebene des gesamten Gesäugekomplexes abspielen, die Entwicklung von Stülpzitzen beeinflussen. Die differenziell exprimierten Gene könnten, ähnlich wie bei den Untersuchungen pränataler Gewebe, den *Ingenuity*-Biofunktionen ‚cell maintenance, proliferation, differentiation and replacement‘, ‚organismal, organ and tissue development‘ und ‚genetic information and nucleic acid processing‘ sowie ‚cell-to-cell signaling and interaction‘ zugeordnet werden (CHOMWISARUTKUN et al. 2012b, 2013).

Insbesondere Gene aus kanonischen Signalwegen von Wachstumsfaktoren wurden detektiert. Dabei wurden auf der Ebene der Liganden, Rezeptoren und nachfolgenden Signalkaskaden Unterschiede in den Abundanzen der Transkripte gezeigt, die mit der Anfälligkeit zur Ausprägung von Stülpzitzen assoziiert sind (Abb. 3).

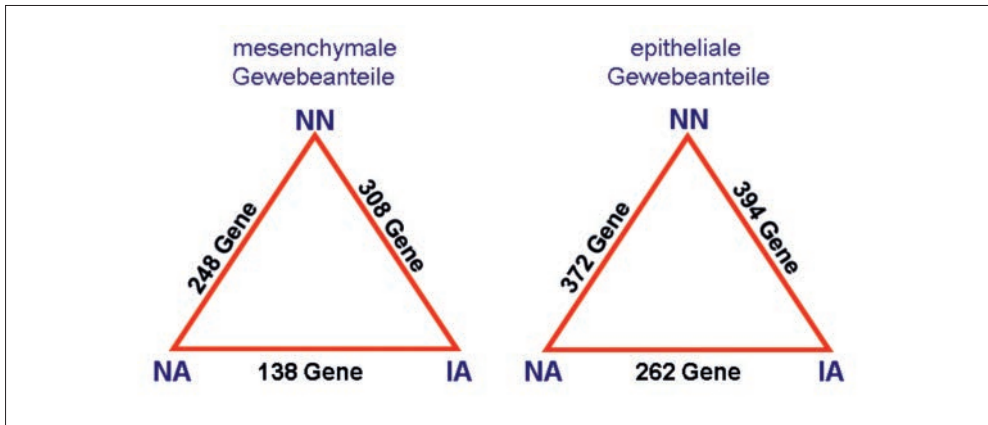


Abb. 2 Schema der Vergleiche in Abhängigkeit vom Affektionsstatus des Tieres und dem Zitzenphänotyp (Kategorien: normal ausgebildete Zitzen nicht-betroffener Tiere [normal, non-affected, ‚NN‘], normal ausgebildete Zitzen betroffener Tiere [normal teat, affected, ‚NA‘] und eingestülpte Zitzen betroffener Tiere [inverted, affected, ‚IA‘]) mit Angabe der Anzahl differenziell exprimierter Gene.

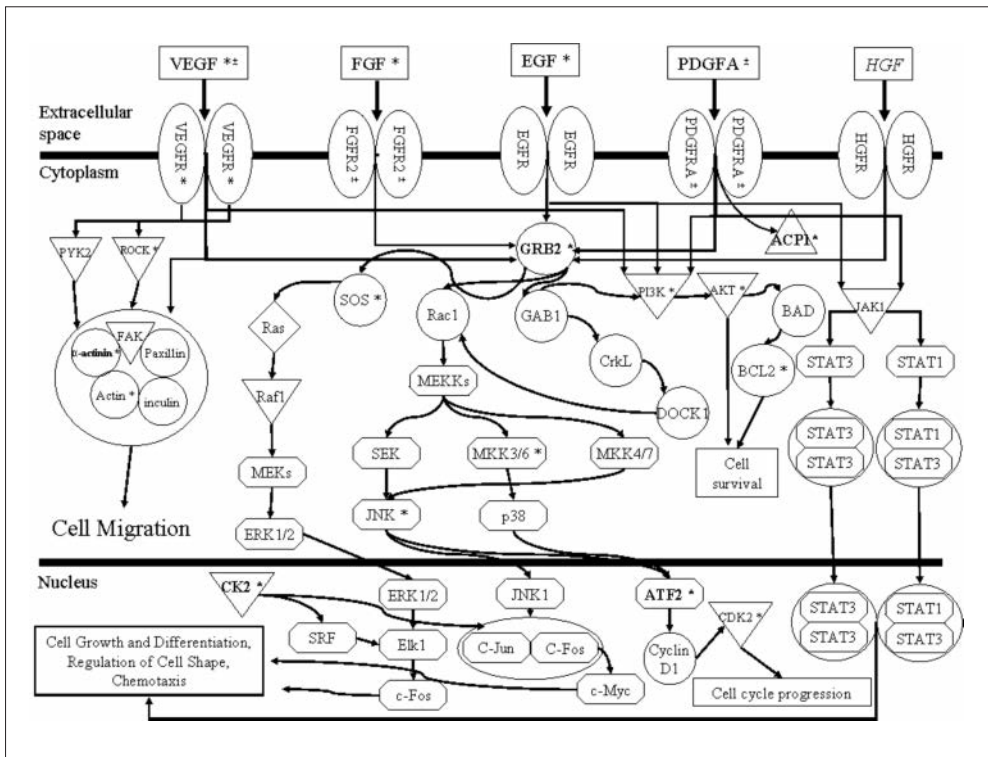


Abb. 3 Darstellung der Signalkaskaden von Wachstumsfaktoren. Gene, die in Mikroarray bzw. Echtzeit-PCR-Experimenten merkmalsassoziiert exprimiert gefunden wurden, sind markiert (\* oder fett Mikroarray und Echtzeit-PCR aus CHOMWISARUTKUN et al. 2012b, ± Echtzeit-PCR aus TETZLAFF et al. 2009).



Die Expressionsanalysen haben somit die Erkenntnisse über relevante Stoffwechselwege erweitert und die Liste funktioneller positioneller Kandidatengene für die Anfälligkeit zur Ausprägung von Stülpzitzen weiter qualifiziert und präzisiert. Validierungsexperimente in kommerziellen Herden werden entsprechend durchgeführt.

## Literatur

- BEECKMANN, P., SCHRÖFFEL, J., MOSER, G., BARTENSCHLAGER, H., REINER, G., and GELDERMANN, H.: Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 1. *J. Anim. Breed. Genet.* *120*, 1–10 (2003)
- BIDANEL, J. P., ROSENDO, A., IANNUCELLI, N., RIQUET, J., GILBERT, H., CARTEZ, J. C., BILLON, Y., AMIGUES, Y., PRUNIER, A., and MILAN, D.: Detection of quantitative trait loci for teat number and female reproductive traits in Meishan × Large White F2 pigs. *Animal* *2*, 813–820 (2008)
- BLENDL, H. M., HUSSLEIN, E., und BLEICHER, H.: Zitzenbeurteilung beim Schwein – ein wesentliches Selektionskriterium. *Bayerisches Landwirtschaftl. Jahrbuch* *58*, 250–255 (1981)
- BREVERN, N., SCHIMPF, B., WÖRNER, R., und SWALVE, H.: Parameterschätzung für Zitzenmerkmale bei Hybridsauen. *Züchtungskunde* *66*, 339–348 (1994)
- CHALKIAS, H., RYDHMER, L., and LUNDEHEIM, N.: Genetic analysis of functional and non-functional teats in a population of Yorkshire pigs. *Livestock Sci.* *152*, 127–134 (2013)
- CHOMWISARUTKUN, K., MURANI, E., BRUNNER, R., PONSUKSILI, S., and WIMMERS, K.: QTL region-specific microarrays reveal differential expression of positional candidate genes of signaling pathways associated with the liability for the inverted teat defect. *Anim. Genet.* *44*, 139–148 (2013)
- CHOMWISARUTKUN, K., MURANI, E., PONSUKSILI, S., and WIMMERS, K.: Gene expression analysis of mammary tissue during fetal bud formation and growth in two pig breeds – indications of prenatal initiation of postnatal phenotypic differences. *BMC Dev. Biol.* *12*, 13 (2012a)
- CHOMWISARUTKUN, K., MURANI, E., PONSUKSILI, S., and WIMMERS, K.: Microarray analysis reveals genes and functional networks relevant to the predisposition to inverted teats in pigs. *J. Anim. Sci.* *90*, 1–15 (2012b)
- CLAYTON, G. A., POWELL, J. L., and HILEY, P. G.: Inheritance of teat number and teat inversion in pigs. *Anim. Prod.* *33*, 299–304 (1981)
- DING, N., GUO, Y., KNORR, C., MA, J., MAO, H., LAN, L., XIAO, S., AI, H., HALEY, C. S., BRENG, B., and HUANG, L.: Genome-wide QTL mapping for three traits related to teat number in a White Duroc × Erhualian pig resource population. *BMC Genet.* *10*, 6 (2009)
- DRAGOS-WENDRICH, M., MOSER, G., BARTENSCHLAGER, H., REINER, G., and GELDERMANN, H.: Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 10. *J. Anim. Breed. Genet.* *120*, 82–88 (2003)
- GÜNTHER, C.: Morphologie der sogenannten „Stülpzitzen“ beim Schwein im Vergleich zum histologischen Bild der normalen Zitzen. Dissertation FU Berlin (1984)
- GUO, Y.-M., LEE, G. J., ARCHIBALD, A. L., and HALEY, C. S.: Quantitative trait loci for production traits in pigs: a combined analysis of two Meishan × Large White populations. *Anim. Genet.* *39*, 486–495 (2008)
- HIROOKA, H., KONING, D. J. DE, HARLIZIUS, B., VAN ARENDONK, J. A., RATTINK, A. P., GROENEN, M. A., BRASCAMP, E. W., and BOVENHUIS, H.: A whole-genome scan for quantitative trait loci affecting teat number in pigs. *J. Anim. Sci.* *79*, 2320–2326 (2001)
- HITTEL, J.: Genetische und umweltbedingte Einflüsse auf die Ausprägung von Zitzenanomalien beim Schwein. Dissertation Georg-August-Universität Göttingen (1984)
- HU, Z.-L., PARK, C. A., WU, X.-L., and REECY, J. M.: Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. *Nucleic Acids Res.* *41*, 871–879 (2013)
- JONAS, E., SCHREINEMACHERS, H. J., KLEINWACHTER, T., ÜN, 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)
- MATZKE, P.: Kraterzitzen – ein erblicher Defekt. *Top Agrar* *11*, 13–14 (1980)
- MAYER, J., and PIRCHNER, F.: Asymmetry and inverted nipples in gilts. *Arch. Tierz.* *38*, 87–91 (1995)
- NIGGEMAYER, A.: Besamungsstation kontrolliert Zitzenvererbung. *Schweinezucht und Schweinemast* *3*, 11 (1993)
- OKA, T., YOSHIMURA, M., LAVANDERO, S., WADA, K., and OHBA, Y.: Control of growth and differentiation of the mammary gland by growth factors. *J. Dairy Sci.* *74*, 2788–2800 (1991)
- OLTMANN, I.: QTL-Analyse an den Chromosomen 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 und 17 in einer porcinen Ressourcepopulation. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2003)

- SATO, S., ATSUJI, K., SAITO, N., OKITSU, M., SATO, S., KOMATSUDA, A., MITSUHASHI, T., NIRASAWA, K., HAYASHI, T., SUGIMOTO, Y., and KOBAYASHI, E.: Identification of quantitative trait loci affecting corpora lutea and number of teats in a Meishan × Duroc F2 resource population. *J. Anim. Sci.* 84, 2895–2901 (2006)
- STEFFENS, S.: Stülpzitzen – ein Problem in der Schweinezucht. *Schweine-Zucht und Schweine-Mast* 93, 8–11 (1993)
- ÜN, C.: QTL Untersuchungen auf Gesäugequalität mittels Mikrosatellitenmarker auf Chromosomen 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18 in einer porcinen Ressourcepopulation. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2002)
- TATE-OSTROFF, B. A., and BRIDGES, B. S.: Nipple development and pup-induced prolactin release in male rats treated prenatally with the antiandrogen flutamide. *Psychoneuroendocrinology* 13, 309–316 (1988)
- TETZLAFF, S., MURANI, E., SCHELLANDER, K., PONSUKSILI, S., and WIMMERS, K.: Differential expression of growth factors and their receptors indicates their involvement in the inverted teat defect in pigs. *J. Anim. Sci.* 87, 3451–3457 (2009)
- WADA, Y., AKITA, T., AWATA, T., FURUKAWA, T., SUGAI, N., INAGE, Y., ISHII, K., ITO, Y., KOBAYASHI, E., KUSUMOTO, H., MATSUMOTO, T., MIKAWA, S., and MIYAKE, M.: Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishan × Gottingen crosspopulation. *Anim. Genet.* 31, 376–384 (2000)
- WILLHAM, R. L., and WHATLEY, J. A.: Genetic variation in nipple number in swine. *J. Anim. Breed. Genet.* 78, 350–363 (1963)
- YUE, G., SCHRÖFFEL, J., MOSER, G., BARTENSCHLAGER, H., REINER, G., and GELDERMANN, H.: Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 12. *J. Anim. Breed. Genet.* 120, 95–102 (2003)
- ZHANG, J., XIONG, Y., ZUO, B., LEI, M., JIANG, S., LI, F., ZHENG, R., LI, J., and XU, D.: Detection of quantitative trait loci associated with several internal organ traits and teat number trait in a pig population. *J. Genet. Genomics* 34, 307–314 (2007)

Prof. Dr. Klaus WIMMERS  
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf  
Institut für Genombiologie  
Wilhelm-Stahl-Allee 2  
18196 Dummerstorf  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 38208 68700  
Fax: +49 38208 68702  
E-Mail: klauswimmers@yahoo.de

# Molekulare Aufklärung von Erbdefekten bei Schafen und Ziegen unter besonderer Berücksichtigung eines Hypopigmentierungssyndroms beim Kamerunschaf

Gesine LÜHKEN (Gießen)

Mit 4 Abbildungen und 2 Tabellen

## Zusammenfassung

Bisher wurden beim Schaf über 40 und bei der Ziege 8 DNA-Varianten identifiziert, die in den meisten Fällen autosomal-rezessiv erbliche Störungen verschiedener Organe und Körperfunktionen verursachen. Einige wenige dieser Defektallele wirken sich bei Heterozygotie günstig auf züchterisch erwünschte Merkmale aus und wurden durch entsprechende Selektion bzw. Einkreuzung über einzelne Herden oder Rassen hinaus international verbreitet. Die Analyse funktioneller Kandidatengene war in der Vergangenheit die erfolgreichste Methode zur Identifizierung von kausalen DNA-Varianten für Erbdefekte bei Schafen und Ziegen. Mit Hilfe von genomweiten Kopplungs- oder Assoziationsanalysen konnten, bedingt durch bestimmte Nachteile der meistens verwendeten Mikrosatellitenmarker, dagegen nur in wenigen Fällen Chromosomenregionen so weit eingegrenzt werden, dass durch nachfolgende Analysen kausale DNA-Varianten für Erbdefekte identifiziert werden konnten. Mit der Verfügbarkeit des ovinen 50k SNP-Chip konnte der genomweite Ansatz zur molekularen Aufklärung von Erbdefekten beim Schaf jedoch eine Reihe von Erfolgen verbuchen. Ähnliches kann für die Ziege durch die kürzlich erfolgte Fertigstellung eines caprinen 50k SNP-Chip erhofft werden. Das Beispiel der Identifizierung einer etwa 110 kbp großen Deletion, die das *EDNRB*-Gen einschließt, als Ursache für ein Hypopigmentierungssyndrom beim Kamerunschaf zeigt, dass bei zwingenden Hinweisen auf ein funktionell beteiligtes Gen auch heute noch die Kandidatengenenanalyse das Mittel der Wahl zur Aufklärung von Erbdefekten sein kann.

## Abstract

Until now, more than 40 ovine and 8 caprine DNA variants have been identified which cause in most cases autosomal recessive inherited disorders of diverse organs and body functions. Few of these causative alleles have positive effects on breeding traits and therefore were distributed worldwide from single founder flocks or breeds by selection or crossing. In the past, the analysis of functional candidate genes was the most successful method for identification of DNA variants which cause inherited defects in sheep and goats. Due to some disadvantages of the used microsatellite markers, genome-wide linkage or association analyses only in few cases were able to narrow down a chromosomal region sufficiently to identify defect-causing alleles by subsequent analyses. However, with the availability of the ovine 50k SNP chip, the genome-wide approach was successfully used to unravel the molecular mechanisms of quite a number of inherited disorders. Similar success may be expected for the goat, as a caprine 50k SNP chip has been established recently. Nevertheless, the candidate gene approach remains the method of choice in cases where mandatory evidence exists for a certain involved gene. An actual example is the identification of an approximately 110 kbp deletion, including the *EDNRB*-gene and causing a hypopigmentation syndrome in Kamerun sheep, with the candidate gene approach.

## 1. Übersicht

Die Verfügbarkeit molekulargenetischer Methoden und Techniken hat auch bei Heim- und Nutztieren dazu geführt, dass immer mehr Genvarianten (Mutationen), die erbliche Merkmale

und Störungen verursachen, identifiziert werden konnten. In der OMIA (*Online Inheritance in Animals*)-Datenbank ([www.omia.org.au](http://www.omia.org.au)) waren Anfang September 2013 mit 171 die meisten kausalen Genvarianten für den Hund aufgeführt, gefolgt vom Rind mit 86 Einträgen. Von den kleinen Wiederkäuern liegt das Schaf mit 42 kausalen Genvarianten im vorderen Mittelfeld, während für die Ziege mit 8 identifizierten ursächlichen Genvarianten deutlich weniger Kenntnisse vorliegen als für das Schaf (Abb. 1).

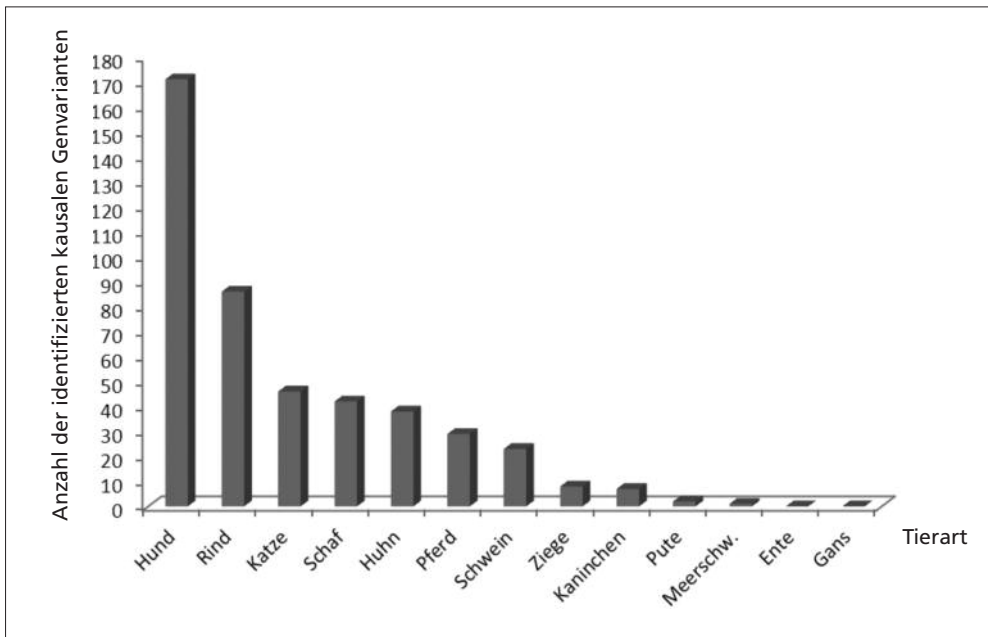


Abb. 1 Anzahl der in der OMIA-Datenbank aufgeführten Genvarianten, die als ursächlich für erbliche Merkmale und Störungen bei verschiedenen Heim- und Nutztieren identifiziert wurden ([www.omia.org.au](http://www.omia.org.au); Stand: 11. 9. 2013).

Ein Teil dieser Genvarianten verursacht Krankheiten oder Störungen, die sich als sogenannte Erbdefekte (Erbfehler, Erbkrankheiten) signifikant auf Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Tiere auswirken und in ihrem Auftreten nicht oder nur in einem sehr geringen Ausmaß von der Umwelt und anderen Genvarianten beeinflusst werden. Die Identifizierung solcher Defektallele ist sehr bedeutsam, sowohl zur Aufklärung des zugrundeliegenden molekulargenetischen Mechanismus als auch zur Entwicklung von Gentests – hier vor allem zur Entdeckung und zum Zuchtausschluss von Anlageträgern bei rezessiver Vererbung.

Beim Schaf betreffen Erbdefekte, für die kausale Genvarianten identifiziert werden konnten, die Haut und das Bindegewebe, das Skelettsystem, die Muskulatur, das Nervensystem, die Augen, die Blutgerinnung und die Ovarfunktion (Tab. 1). Bei der Ziege wurden für Erbdefekte, die die Muskulatur, das Nervensystem, die körperliche und kognitive Entwicklung sowie die Geschlechtsentwicklung betreffen, ursächliche Genvarianten aufgedeckt (Tab. 2). Mit wenigen Ausnahmen werden die in den beiden Tabellen genannten Erbdefekte autosomal-rezessiv vererbt. Eine Zusammenstellung der Erbgänge, der betroffenen Gene, der Art und Lokalisation der kausalen Genvarianten sowie der Originalpublikationen bezüglich Erbdefekten bei Schafen und Ziegen ist bei LÜHKEN (2012) zu finden.

Tab. 1 Molekulargenetisch aufgeklärte Erbdefekte beim Schaf

Organ(system) / Funktion	Erkrankung / Störung	Betroffene Rassen
Haut, Bindegewebe	Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VII Epidermolysis bullosa (Herlitz-Typ) Hypotrichose Letales Hypopigmentierungssyndrom (Waardenburg-Syndrom Typ IVA) Porphyria cutanea tarda	White Dorper Dt. Schwarzköpfiges Fleischschaf Valle del Bellice Kamerunschaf (einzelne Herde)  Schwarzköpfige Rasse (einzelne Herde)
Skelettsystem	Chondrodysplasie (Spinnengliedrigkeit) Chondrodysplasie (Texel) Hereditäre hypophosphatämische Rachitis	verschiedene schwarzköpfige Rassen Texel Corriedale
Muskulatur	Mc Ardle-Krankheit (Glykogenspeicherkrankheit V)	Merino (einzelne Herde)
Nervensystem (u. a.)	Gaucher-Krankheit Typ I	Southdown (einzelne Herde)
Nervensystem	Erkrankung des unteren Motoneurons Gangliosidose (GM1) Gangliosidose (GM2, Typ 1) Morbus Batten (neuronale Ceroid-Lipofuszinose V) Morbus Batten (neuronale Ceroid-Lipofuszinose VI) Morbus Batten (neuronale Ceroid-Lipofuszinose X)	Romney Marsh Romney Jakobsschaf Borderdale (einzelne Herde)  Merino (einzelne Herde)  White Swedish Landrace (einzelne Herde)
Augen	Mikrophthalmie Tagblindheit	Texel Awassi
Blutgerinnung	Hämophilie A	Weißes Alpenschaf
Ovar	Sterilität, Belclare (FecX <sup>B</sup> ) Sterilität, Galway (FecX <sup>G</sup> )  Sterilität, Hanna (FecX <sup>H</sup> ) Sterilität, high fertility (FecG <sup>H</sup> )  Sterilität, Iceland/Thoka (FecI <sup>f</sup> /FecI <sup>T</sup> ) Sterilität, Inverdale (FecX <sup>L</sup> ) Sterilität, Lacaune (FecX <sup>L</sup> ) Sterilität, Rasa Aragonesa (FecX <sup>R</sup> )	Ursprungsrasse: Belclare Ursprungsrassen: Belclare, Cambridge  Ursprungsrasse: Romney Ursprungsrassen: Belclare, Cambridge, Lacaune  Ursprungsrasse: Islandschaf Ursprungsrasse: Romney Ursprungsrasse: Lacaune Ursprungsrasse: Rasa Aragonesa

Tab. 2 Molekulargenetisch aufgeklärte Erbdefekte bei der Ziege

Organ(system), Funktion	Erkrankung / Störung	Betroffene Rassen
Muskulatur	Myotonie	Myotonic (Fainting) Goat
Nervensystem (u. a.)	Mukopolysaccharidose IIID	Anglo-Nubier
Nervensystem	Beta-Mannosidose	Anglo-Nubier
Körperliche und kognitive Entwicklung	Kongenitaler Kropf und Hypothyreose	Holländische Rasse
Geschlechtsentwicklung	Hornlosigkeits-Intersexualitäts-Syndrom (PIS)	auf Hornlosigkeit selektierte Rassen

Von den meisten in Tabelle 1 und 2 aufgelisteten Erbdefekten sind nur einzelne Rassen betroffen. Einige der erblichen Erkrankungen und Störungen wurden sogar nur in einer einzelnen Herde beobachtet, und es kam offensichtlich nicht zur weiteren Verbreitung der zugrundeliegenden Genvariante innerhalb dieser oder sogar in anderen Rassen, beispielsweise bei den verschiedenen Formen des *Morbus Batten* (Tab. 1).

Nicht beschränkt auf eine Rasse oder sogar nur auf eine Herde sind die Allele, die die Chondrodysplasie (Spinnengliedrigkeit, *Spider Lamb Syndrome*) und die Ovar-bedingte Sterilität beim Schaf sowie das Hornlosigkeits-Intersexualitäts-Syndrom (PIS) bei der Ziege verursachen. Der Grund für die Verbreitung dieser Erbdefekte über die Ursprungsrassen hinaus ist ein positiver Effekt der betreffenden kausalen Genvarianten auf erwünschte züchterische Merkmale bei heterozygoten Tieren: Die Chondrodysplasie beim Schaf ist bedingt durch das homozygote Vorliegen einer Nukleotidsubstitution, die einen Aminosäureaustausch im *Fibroblast Growth Factor Receptor 3* verursacht (BEEVER et al. 1998, 2006). Die betroffenen Lämmer zeigen entweder bei der Geburt oder erst nach einigen Wochen Deformationen des Skeletts mit verlängerten, gebogenen und dünnen Beinen bzw. verkrümmter, aufgebogener Wirbelsäule und sind unter praxisüblichen Aufzuchtbedingungen nicht lebensfähig. Es wird vermutet, dass sich das Defektallel in heterozygoter Form günstig auf das Körperwachstum auswirkt (BEEVER et al. 2006) und aus diesem Grund beispielsweise in den USA in den 1980er und 1990er Jahren durch entsprechende Selektion in verschiedene für die Fleischproduktion gezüchtete schwarzköpfige Schafrassen verbreitet wurde. BEEVER et al. (2006) ermittelten 28,9 % Anlageträger in einer Zuchtauswahl von fünf schwarzköpfigen Schafrassen. Auch bei Deutschen Suffolk-Schafen wurde in der Vergangenheit eine Frequenz von 4 % des Defektallels festgestellt (DRÖGEMÜLLER et al. 2005). Die Verfügbarkeit eines kommerziellen Gentests (BEEVER and COCKETT 2001) hat mittlerweile zu einem starken Rückgang von Merkmals- und Anlageträgern in betroffenen Schafrassenpopulationen geführt (JOLLY et al. 2004).

Verschiedene Genvarianten, die beim Schaf zu einer erhöhten Ovulationsrate und damit zu höheren Lämmerzahlen führen, wurden zur Steigerung der Fruchtbarkeit aus den Ursprungsrassen weltweit in andere Schafrassen eingekreuzt. Das wohl berühmteste Beispiel ist das des  $FecB^B$  (Fecundity, Booroola)-Allels, das zunächst bei Merinoschafen der australischen „Booroola“-Farm auftrat und in heterozygoter Form die Ovulationsrate um 1,5 Follikel und die Wurfgröße um 1,0 Lämmer und in homozygoter Form zu einer Erhöhung um 3,0 ovulierende Follikel und 1,5 Lämmer im Wurf führt (DAVIS 2005). Die Identifikation der verant-

wortlichen nicht-synonymen Nukleotidsubstitution im *Bone Morphogenetic Protein Receptor* IB (*BMPRI*B)-Gen (MULSANT et al. 2001, SOUZA et al. 2001, WILSON et al. 2001) erleichterte die züchterische Selektion auf *FecB<sup>B</sup>*-Träger durch die nun mögliche Entwicklung eines direkten Gentests. Auch in den Genen für das *Bone Morphogenetic Protein 15* (*BMP15*) und den *Growth Differentiation Factor 9* (*GDF9*) wurden verschiedene Genvarianten gefunden, die einen Einfluss auf die Ovulation haben. Hierdurch ist eine größere Auswahl an Schafrassen verschiedener Phänotypen und unterschiedlicher Leistungen in anderen Zuchtmerkmalen gegeben, die zur Erhöhung der Fruchtbarkeit in weniger fruchtbare Rassen eingekreuzt werden können. Allerdings haben alle bis vor wenigen Jahren in diesen beiden Genen identifizierten Varianten im Gegensatz zum *FecB<sup>B</sup>*-Allel nur in heterozygoter Form einen steigernden Einfluss auf die Ovulationsrate und die Wurfgröße, während sie in homozygoter Form Sterilität bewirken. Sie stellen daher Defektallele dar (Tab. 1). Die *FecX<sup>1</sup>*-Variante (*Fecundity*, *Inverdale*), eine nicht-synonyme Nukleotidsubstitution im *BMP15*, wurde bereits vor dem *FecB<sup>B</sup>*-Allel identifiziert (GALLOWAY et al. 2000). Zur Vermeidung der Entstehung unfruchtbarer weiblicher Nachzucht wird den Züchtern empfohlen, Anlageträger nur mit Nicht-Anlageträgern zu verpaaren.

Eine etwa 11,6 kbp große Deletion auf dem Chromosom 1 in der Nähe des nicht-kodierenden *PIS-regulated Transcript 1* (*PISRT1*) und des *Forkhead Box L2*-Gens (*FOXL2*) führt bei homozygoten Ziegen zur Intersexualität (PAILHOX et al. 2001). Trotz der damit verbundenen Unfruchtbarkeit ist dieses Defektallel in vielen europäischen und auch in nicht-europäischen Ziegenrassen verbreitet (KIJAS et al. 2013), da sowohl der homozygote als auch der entsprechende heterozygote Genotyp mit züchterisch erwünschter Hornlosigkeit assoziiert sind (ASDELL 1944). Als Ursache für diese Pleiotropie wird ein hemmender Einfluss der Deletion sowohl auf die Differenzierung des Ovars als auch der Hornknospen (über *FOXL2*) sowie ein positiver Einfluss auf die Hodenentwicklung (über *PISRT1*) vermutet (PAILHOX et al. 2005, ALLAIS-BONNET et al. 2013). Dieser Zusammenhang hat zur Folge, dass eine Zucht ausschließlich genetisch hornloser Ziegen nicht möglich ist und bei der Verpaarung von hornlosen Tieren ein Teil der Nachkommen intersexuell ist.

## 2. Aufklärung von Erbdefekten: Verschiedene Methoden führen zum Ziel

Die klassische Methode zur Identifizierung von Erbdefekten, die Analyse funktioneller Kandidatengene, wurde in der Vergangenheit am häufigsten zur Aufklärung von Erbdefekten bei Schafen und Ziegen eingesetzt. Zur Auswahl der Kandidatengene wurden Erkenntnisse vor allem aus dem Bereich der Humanmedizin, aber auch von anderen Spezies herangezogen. Notwendige Gensequenzdaten konnten vor allem vom eng mit den kleinen Wiederkäuern verwandten Rind genutzt werden, für das 6 Jahre früher eine erste Version der Gesamt-Genomsequenz zur Verfügung stand ([www.genome.gov/12512874](http://www.genome.gov/12512874)) als für das Schaf (*The International Sheep Genomic Consortium* et al. 2010). Für die Ziege wurde eine erste Gesamtgenomsequenz erst kürzlich veröffentlicht (DONG et al. 2013).

Allerdings ist der klassische Kandidatengenansatz problematisch, wenn zu viele Gene in Frage kommen (z. B. bei komplexen Phänotypen) oder kein Gen bekannt ist, das funktionell mit dem Defektphänotyp im Zusammenhang stehen könnte. Auch werden bei diesem methodischen Ansatz wenig oder gar nicht funktionell charakterisierte Gene oder Chromosomenregionen nicht in die Analysen mit einbezogen.



Eine alternative Herangehensweise ist die Analyse der Kopplung oder Assoziation von vielen, am besten über das gesamte Genom verteilten anonymen Sequenzvarianten (sogenannten Markern). Eine vollständige Kopplung oder Assoziation solcher Marker mit dem Phänotyp wird dabei selten beobachtet, da die typisierten Sequenzvarianten meistens aus nicht-funktionellen Genombereichen stammen und daher selbst den Phänotyp nicht beeinflussen. Allerdings können sich aus der Kopplung oder Assoziation von Markern mit dem Phänotyp häufig Hinweise auf eine oder mehrere Genomregionen ergeben, in denen eine kausale Genvariante vermutet werden kann. Je kleiner dieser gekoppelte oder assoziierte Genombereich ist, desto leichter fällt in der Regel die Auswahl der anschließend zu analysierenden Chromosomenregionen bzw. Kandidatengene.

Wie bei anderen Haustierarten auch wurden in der Vergangenheit für Kopplungs- oder Assoziationsanalysen beim Schaf und bei der Ziege fast ausschließlich Mikrosatellitenmarker eingesetzt. Viele der für die kleinen Wiederkäuer verwendeten Marker konnten wiederum vom Rind abgeleitet werden. Durch unterschiedliche Anzahl der Wiederholung von zwei Nukleotiden ergeben sich bei diesem Markertyp unterschiedliche Fragmentlängen, die relativ einfach zu typisieren sind. Beispielsweise konnte durch Kopplungsanalyse mit Mikrosatelliten der *FecB*-Genort auf dem ovinen Chromosom 6 auf eine Region eingegrenzt werden, in der auch *BMPRI1B* kartiert worden war (MONTGOMERY et al. 1994). Auch die chromosomale Lage der das Hornlosigkeits-Intersexualitäts-Syndrom bei der Ziege verursachenden Deletion wurde über Kopplungsanalysen mit Mikrosatelliten eingegrenzt (SCHIBLER et al. 2000, PAILHOX et al. 2001). Da der betreffende Chromosomenbereich nicht-kodierend ist und seine Funktion zu dieser Zeit nicht bekannt war, wäre er über einen funktionellen Kandidatengenansatz nicht identifiziert worden.

Ein polymorpher Mikrosatellit soll etwa alle 30000 bp im Genom vorkommen (KNIPPERS 2012). Diese relativ geringe Markerdichte ergibt in ungünstigen Fällen sehr große Abstände zu kausalen Genvarianten. Zusätzlich zu dieser Spezies-übergreifenden Problematik waren in der Vergangenheit für das Schaf und vor allem für die Ziege deutlich weniger Marker kartiert als für das Rind (IHARA et al. 2004, MADDOX 2005). Nicht zuletzt ist auch die nicht vollständige Automatisierbarkeit der Mikrosatellitenanalyse sicherlich mitverantwortlich dafür, dass nur wenige Erbdefekte bei Schafen und Ziegen unter Einbeziehung einer chromosomen- oder genomweiten Mikrosatellitenanalyse aufgeklärt wurden.

Ein anderer Markertyp, Einzelbasenpaarpolymerphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs), kommt deutlich häufiger im Genom vor als Mikrosatelliten (etwa alle 500 bp). SNPs können auf einem DNA-Array (Chip) durch die Methode der Hybridisierung vollautomatisch analysiert werden, und das bis zu einer Anzahl von mehreren Millionen gleichzeitig. Allerdings sind SNPs nicht zwischen Tierarten übertragbar, sondern müssen für jede Spezies zunächst unter Einbeziehung möglichst vieler Rassen identifiziert und bezüglich ihrer Häufigkeit (Frequenz) untersucht werden. Durch die Zusammenarbeit des *International Sheep Genomics Consortium* (ISGC) und weiterer Partner wurde für das Schaf ein mittlerweile kommerziell verfügbarer SNP-Chip mit rund 50000 (50k) SNPs vor wenigen Jahren entwickelt ([www.sheepmap.org](http://www.sheepmap.org); [www.illumina.com](http://www.illumina.com)). Für die Ziege ist ein 50k SNP-Chip erst vor kurzem durch ein ähnliches Projekt fertiggestellt worden ([www.goatgenome.org](http://www.goatgenome.org)).

## 2.1 Aufklärung der molekularen Ursache eines Hypopigmentierungssyndroms beim Kamerunschaf durch Analyse eines funktionellen Kandidatengens

In einer Herde von Kamerunschafen, die üblicherweise braun-schwarz gefärbt sind, wurden insgesamt fünf Lämmer mit mehr oder weniger vollständig weißem Haarkleid und hellblauer Augenfarbe geboren (Abb. 2), die innerhalb weniger Stunden bis Tage starben. Einige der Lämmer zeigten ein aufgetriebenes Abdomen, aber es blieb anamnestisch ungeklärt, ob die Lämmer bis zum Tode überhaupt Mekonium abgesetzt hatten.

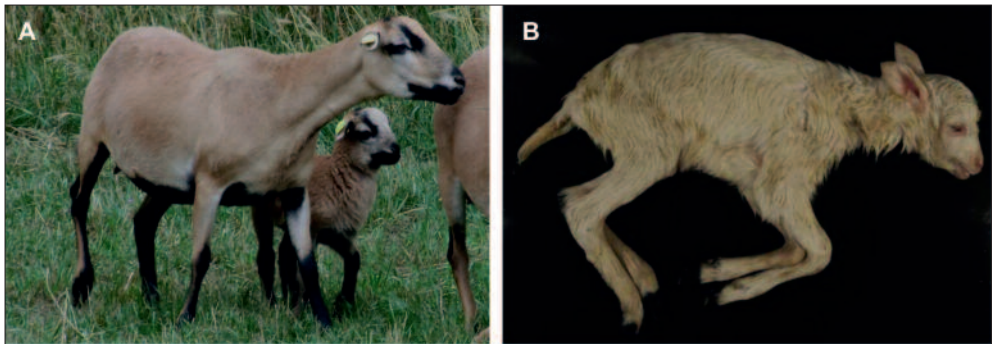


Abb. 2 Phänotypisch normale Kamerunschafe (A), verendetes hypopigmentiertes Kamerunschaf (B). (Abb. aus LÜHKEN et al. 2012)

Da alle Lämmer vom selben Bock abstammen, der zudem auch in einigen Fällen mit verwandten Schafen ersten Grades verpaart worden war, wurde ein rezessiv wirkender Gendefekt als Ursache für diese Todesfälle vermutet. Das erbliche Waardenburg-Syndrom vom Typ IV (WS4) des Menschen ist durch Pigmentierungsstörungen (weiße Haut- und Haarflecken, hellblaue oder verschiedenartig gefärbte Iris) in Verbindung mit Taubheit und einem Megacolon geprägt (OMENN and MCKUSICK 1979, SHAH et al. 1981). Das Megacolon wird durch eine funktionelle Darmstenose variabler Länge verursacht, die durch das Fehlen der von der Neuralleiste stammenden intramuralen Darmganglien bedingt ist und als solitäre Symptomatik auch unter dem Namen Hirschsprungsche Krankheit bekannt ist (MCCALLION und CHAKRAVARTI 2001). Bei etwa der Hälfte der WS4-Patienten befindet sich die ursächliche Mutation im *Sex Determining Region Y-Box 10 (SOX10)*-Gen, während ein kleinerer Anteil der Erkrankungen durch Varianten der Gene für das Endothelin-3 (*EDN3*) und für den *Endothelin Receptor Type B (EDNRB)* verursacht wird (PINGAULT et al. 2010). Auch beim Pferd, bei der Ratte und bei der Maus führen Mutationen im *EDNRB*-Gen (Nukleotidsubstitutionen bis hin zur Deletion des kompletten Gens) zu WS4-ähnlichen Erscheinungen (HOSODA et al. 1994, CECCHERINI et al. 1995, GARIEPY et al. 1996, METALLINOS et al. 1998, SANTSCHI et al. 1998, YANG et al. 1998). Aufgrund dieser bemerkenswerten Spezies-übergreifenden Zusammenhänge zwischen Variation am *EDNRB*-Genort und WS4-ähnlichen Erscheinungen fiel die Wahl des als erstes im Zusammenhang mit dem Hypopigmentierungssyndrom beim Kamerunschaf zu analysierenden Kandidatengens auf *EDNRB*. Mit DNA-Proben betroffener Lämmer konnte jedoch überraschenderweise keines der

sieben Exons des Gens amplifiziert werden, während dies mit DNA von verwandten und unverwandten phänotypisch normalen Schafen möglich war (LÜHKEN et al. 2012). Die Vermutung, dass bei den hypopigmentierten Lämmern auf beiden Chromosomen ein mehr oder weniger großer Bereich des *EDNRB*-Gens deletiert sein könnte, konnte sowohl durch quantitative PCR-Analyse der *EDNRB*-Kopienzahl als auch durch zytogenetische Untersuchungen bestätigt werden (LÜHKEN et al. 2012). Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) eines das *EDNRB*-Gen beinhaltenden bovinen BAC-Klons auf Metaphase-Chromosomen von der Mutter eines hypopigmentierten Lamms ergab ein Signal auf nur einem Chromosom, während die Analyse von Metaphase-Chromosomen eines unverwandten, phänotypisch normalen Schafes Signale auf zwei homologen Chromosomen ergab (Abb. 3). Umfangreiche Sequenzanalysen der *EDNRB*-Region und der flankierenden Bereiche ermöglichten schließlich die genaue Lokalisation einer etwa 110 kbp großen Deletion auf dem Chromosom 10 (Abb. 4A) als Ursache für das Hypopigmentierungssyndrom sowie die Entwicklung eines PCR-basierten Gentests (Abb. 4B). Außerhalb der Schafherde, in der die hypopigmentierten Lämmer aufgetreten waren, konnten unter 127 Kamerunschafen aus 7 verschiedenen Herden, die mit Hilfe des Gentests untersucht wurden, keine weiteren Träger der *EDNRB*-Deletion gefunden werden. Bei dem einzigen für eine patho-histologische Untersuchung zur Verfügung stehenden hypopigmentierten Lamm wurden zwar eine Dilatation des Darms und noch vorhandenes Mekonium festgestellt, allerdings auch in Proben von verschiedenen Darmabschnitten immunhistologisch Ganglien nachgewiesen. Die Frage, ob beim Schaf die Entstehung einer Aganglionose bei homozygotem Ausfall des *EDNRB*-Gens, ähnlich wie bei verschiedenen Rattenlinien (DANG et al. 2011), vom genetischen Hintergrund des betroffenen Tieres abhängig ist, bietet Anlass zu weiteren Untersuchungen.

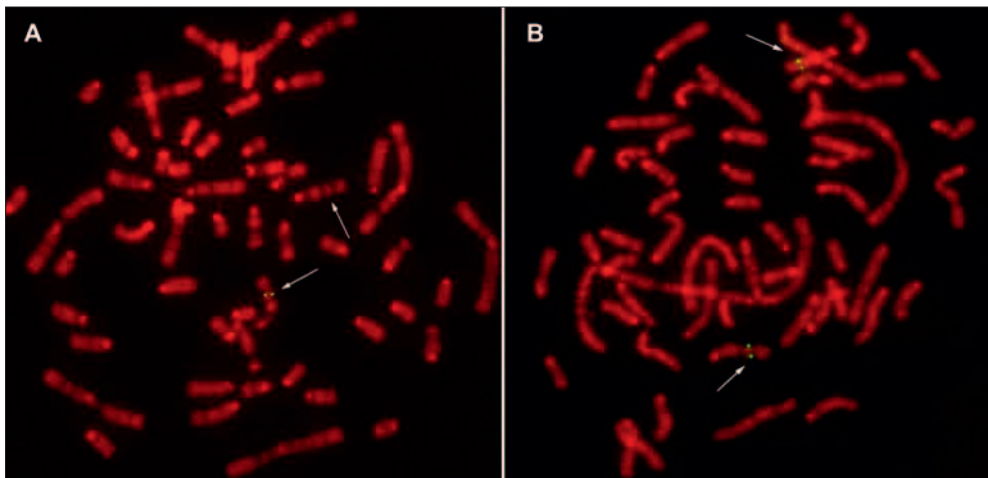


Abb. 3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) eines das *EDNRB*-Gen beinhaltenden bovinen BAC-Klons auf Metaphase-Chromosomen der Mutter eines hypopigmentierten Lamms (A) und eines nicht verwandten, phänotypisch normalen Schafs (B). Pfeile deuten auf vorhandene bzw. nicht vorhandene FISH-Signale auf den homologen Chromosomen. (Abb. aus LÜHKEN et al. 2012)

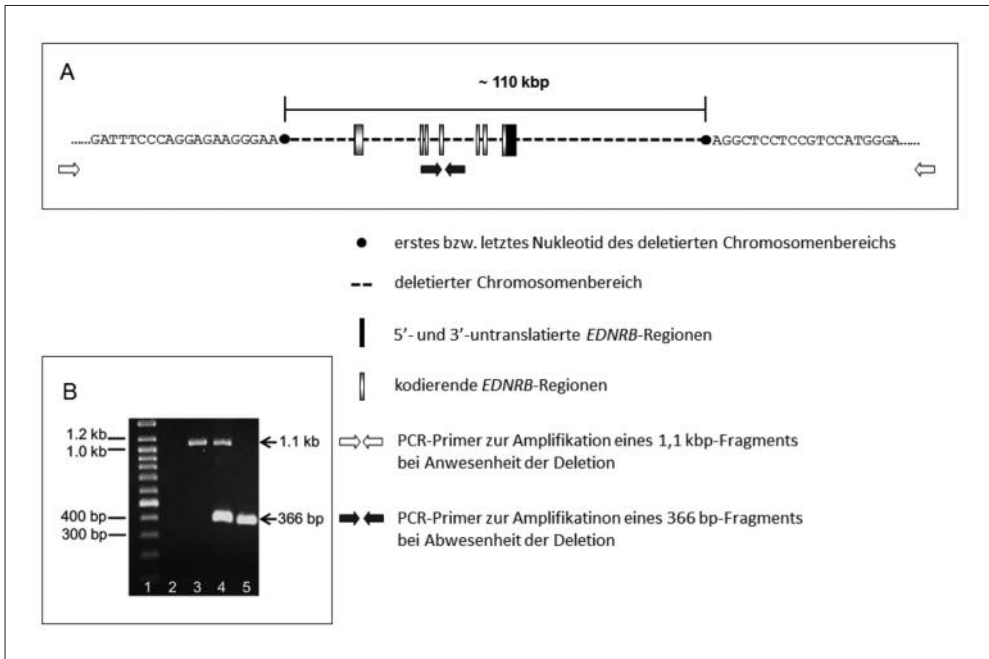


Abb. 4 (A) Nukleotidsequenz vor bzw. hinter einer ca. 110 kbp großen Deletion auf dem ovinen Chromosom 10 mit Angabe der Lage von *EDNRB*-Genregionen und der für den entwickelten Gentest verwendeten Primersequenzen. (B) Nachweis der Deletion durch Agarosegelelektrophorese PCR-amplifizierter Sequenzbereiche: 1, 100 bp-Marker; 2, Negativkontrolle; 3, Schaf mit homozygoter Deletion (hypopigmentiertes Lamm); 4, Schaf mit heterozygoter Deletion (Mutter eines hypopigmentierten Lamms); 5, Schaf ohne Deletion (phänotypisch normal). (Abb. aus LÜHKEN et al. 2012, modifiziert)

## 2.2 Erfolge bei der Aufklärung von Erbdefekten mit dem ovinen 50 k SNP-Chip

Zwischen 2010 und 2012 wurde mit 7 von insgesamt 12 mehr als die Hälfte der in diesem Zeitraum identifizierten ovinen Defektallele durch vorausgehende genomweite Assoziationsanalysen unter Verwendung des 50k SNP-Chips entdeckt. Die Mikrophthalmie (ein- oder beidseitig fehlende oder zu kleine Augen mit resultierender Blindheit) beim Texelschaf war darunter der erste Erbdefekt, der mithilfe des ovinen 50k SNP-Chips aufgeklärt werden konnte (BECKER et al. 2010). Die kausale Mutation für diesen schon lange bekannten rezessiven Gendefekt wurde zunächst aufgrund der Ergebnisse aus einer Kopplungsanalyse auf dem Chromosom 23 vermutet, allerdings lag in dem signifikanten Chromosomenbereich kein funktionell zum Phänotyp passendes Kandidatengen (TETENS et al. 2007). Die Analyse der DNA von Merkmals- und Anlageträgern sowie nicht-verwandten merkmalsfreien Schafen auf dem 50k SNP-Chip ergab dagegen Assoziationen von SNPs auf dem Chromosom 22. Fokussiert auf den Bereich, in dem die SNPs bei allen Merkmalsträgern homozygot waren, zeigte der Vergleich mit dem homologen humanen Chromosomenbereich immer noch eine weitaus zu große Anzahl von Genen, um sie alle auf die kausale Mutation hin zu untersuchen. Allerdings konnte unter funktionellen Aspekten die Auswahl auf zwei Kandidatengene reduziert werden. Durch Sequenzanalyse wurde im Gen für die *Paired-like Homeodomain 3 (PITX3)* eine zum Ami-

nosäureaustausch führende Nukleotidsubstitution als Ursache für die Mikrophthalmie identifiziert, gegen die nun in der Texelschafpopulation mittels Gentest selektiert werden kann (BECKER et al. 2010).

Kürzlich wurden weitere Allele in den Genen *BMP15* (DEMARS et al. 2013) und *GDF9* (SILVA et al. 2011, VAGE et al. 2013) gefunden, die bemerkenswerterweise nicht wie alle bisher bekannten *BMP15*- und *GDF9*-Varianten homozygot zu Sterilität führen. Einige dieser Allele wurden unter Verwendung des ovinen 50 k SNP-Chip identifiziert.

In der bisher einzigen publizierten Studie, in der der neuentwickelte und bisher noch nicht kommerziell verfügbare caprine SNP-Chip verwendet wurde, konnte durch eine genomweite Assoziationsstudie die chromosomale Lage des bereits über eine Dekade zuvor durch Kopplungsanalyse und Sequenzierung ermittelten PIS-Locus bestätigt werden (PAILHOX et al. 2001, KIJAS et al. 2013)

### 3. Schlussfolgerungen und Ausblick

Molekular aufgeklärte Erbdefekte bei Schafen und Ziegen betreffen verschiedene Organsysteme und -funktionen. Einige wenige Defektallele haben sich aufgrund der bei Heterozygotie günstigen Auswirkung auf züchterisch erwünschte Merkmale über einzelne Herden oder Rassen hinaus international verbreitet. Die klassische Kandidatengenanalyse war in der Vergangenheit die erfolgreichste Methode zur Identifizierung von kausalen Genvarianten für Erbdefekte von Schafen und Ziegen. In den letzten Jahren wurde auch der 50k SNP-Chip beim Schaf sehr erfolgreich zur Identifizierung kausaler Genvarianten eingesetzt. Er vereint den Vorteil des genomweiten Ansatzes, vorab kein funktionelles Kandidatengen kennen bzw. auswählen zu müssen, mit einer – im Vergleich zu Mikrosatellitenmarkern – relativ hohen Markerdichte. Allerdings ist bei Verwendung des 50k-Chips in der Regel nach wie vor die Sequenzanalyse eines oder mehrerer Gene notwendig, um schließlich die für einen Erbdefekt kausale Mutation zu ermitteln. Es ist zu erwarten, dass mit dem derzeit in der Entwicklung befindlichen ovinen 700k SNP-Chip ([www.sheepmap.org](http://www.sheepmap.org)) entsprechende Arbeiten erheblich abgekürzt werden können, da durch die sehr viel höhere Markerdichte im Vergleich zum 50k SNP-Chip betroffene Chromosomenbereiche bzw. eventuell sogar schon konkrete Genbereiche deutlich enger eingegrenzt werden können.

Auch für die Ziege ist damit zu rechnen, dass durch den seit kurzem vorhandenen 50k SNP-Chip Erbdefekte molekular aufgeklärt werden können, bei denen die klassischen Methoden bisher erfolglos waren oder die aufgrund der Datenlage bezüglich funktioneller Kandidatengene noch gar nicht molekulargenetisch analysiert wurden. Wie das Beispiel des Hypopigmentierungssyndroms beim Kamerunschaf zeigt, ist der Kandidatengenansatz auch heute noch vielversprechend, wenn eindeutige Hinweise auf eine möglichst überschaubare Anzahl funktioneller Kandidatengene bestehen. Drei SNPs des ovinen 50k SNP-Chip liegen im Bereich der etwa 110 kbp-großen Deletion, die auch das *EDNRB*-Gen beinhaltet. Die Verwendung des SNP-Chips hätte nur dann die Aufklärung des molekularen Defekts vereinfacht, wenn nicht von vorneherein das *EDNRB*-Gen als aussichtsreichstes Kandidatengen ausgewählt worden wäre.

Über die Verwendung immer dichter SNP-Chips hinaus gilt derzeit *Next Generation Sequencing* (die nächste Generation der DNA-Sequenzierungstechnologie) als die ultimative Methode zur Identifizierung von kausalen Genvarianten. Mit *Next Generation Sequencing*



lassen sich auch sehr große, zuvor durch SNP-Chip-Technologie identifizierte signifikante Chromosomenbereiche komplett sequenzieren oder sogar direkte Genome von Tieren mit unterschiedlichen Phänotypen analysieren. Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung von *Next Generation Sequencing* beim Nutztier ist die Aufklärung der molekularen Ursache für Brachyspina und Abort beim Holstein-Rind (CHARLIER et al. 2012). Allerdings ist *Next Generation Sequencing* trotz bereits gesunkener Preise noch relativ teuer, und es wird für die Auswertung der Sequenzdaten eine Referenz-Genomsequenz der entsprechenden Spezies in hoher Qualität benötigt. Beides sind Nachteile, die für die Ziege noch mehr als für das Schaf die Anwendung von *Next Generation Sequencing* zurzeit noch erschweren.

## Literatur

- ALLAIS-BONNET, A., GROHS, C., MEDUGORAC, I., KREBS, S., DJARI, A., GRAF, A., FRITZ, S., SEICHTER, D., BAUR, A., RUSS, I., BOUET, S., ROTHAMMER, S., WAHLBERG, P., ESQUERRE, D., HOZE, C., BOUSSAHA, M., WEISS, B., THEPOT, D., FOUILLOUX, M. N., ROSSIGNOL, M. N., VAN MARLE-KOSTER, E., HREIETHARSDOTTIR, G. E., BARBEY, S., DOZIAS, D., COBO, E., REVERSE, P., CATROS, O., MARCHAND, J. L., SOULAS, P., ROY, P., MARQUANT-LEGUIENNE, B., LE BOURHIS, D., CLEMENT, L., SALAS-CORTES, L., VENOT, E., PANNETIER, M., PHOCAS, F., KLOPP, C., ROCHA, D., FOUCHET, M., JOURNAUX, L., BERNARD-CAPEL, C., PONSART, C., EGGEN, A., BLUM, H., GALLARD, Y., BOICHARD, D., PAILHOX, E., and CAPITAN, A.: Novel insights into the bovine polled phenotype and horn ontogenesis in Bovidae. *PLoS One* 8, e63512 (2013)
- ASDELL, S. A.: The genetic sex of intersexual goats and a probable linkage with the gene for hornlessness. *Science* 99, 124 (1944)
- 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)
- BEEVER, J. E., and COCKETT, N. E.: Screening for the molecular defect causing spider lamb syndrome in sheep. US patent no. 6,306,591 B1 (2001)
- BEEVER, J. E., SHAY, T. L., ALBRETSON, J., MACIULIS, A., BUNCH, T. D., HOLYOAK, G. R., and COCKETT, N. E.: Identification of the causative mutation in ovine hereditary chondrodysplasia. *Plant & Animal Genome VI Conference*, San Diego, 18.–22. January 1998
- BEEVER, J. E., SMIT, M. A., MEYERS, S. N., HADFIELD, T. S., BOTTEMA, C., ALBRETSSEN, J., and COCKETT, N. E.: A single-base change in the tyrosine kinase II domain of ovine FGFR3 causes hereditary chondrodysplasia in sheep. *Anim. Genet.* 37, 66–71 (2006)
- CECCHERINI, I., ZHANG, A. L., MATERA, I., YANG, G., DEVOTO, M., ROMEO, G., and CASS, D. T.: Interstitial deletion of the endothelin-B receptor gene in the spotting lethal (sl) rat. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2089–2096 (1995)
- CHARLIER, C., AGERHOLM, J. S., COPPIETERS, W., KARLSKOV-MORTENSEN, P., LI, W., JONG, G. DE, FASQUELLE, C., KARIM, L., CIRERA, S., CAMBISANO, N., AHARIZ, N., MULLAART, E., GEORGES, M., and FREDHOLM, M.: A deletion in the bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and brachyspina. *PLoS One* 7, e43085 (2012)
- DANG, R., TORIGOE, D., SUZUKI, S., KIKKAWA, Y., MORITOH, K., SASAKI, N., and AGUI, T.: Genetic background strongly modifies the severity of symptoms of Hirschsprung disease, but not hearing loss in rats carrying Ednrb(sl) mutations. *PLoS One* 6, e24086 (2011)
- DAVIS, G. H.: Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 37, Suppl. 1, S11–23 (2005)
- DEMARS, J., FABRE, S., SARRY, J., ROSSETTI, R., GILBERT, H., PERSANI, L., TOSSER-KLOPP, G., MULSANT, P., NOWAK, Z., DROBIK, W., MARTYNIUK, E., and BODIN, L.: Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genet.* 9, e1003482 (2013)
- DONG, Y., XIE, M., JIANG, Y., XIAO, N., DU, X., ZHANG, W., TOSSER-KLOPP, G., WANG, J., YANG, S., LIANG, J., CHEN, W., CHEN, J., ZENG, P., HOU, Y., BIAN, C., PAN, S., LI, Y., LIU, X., WANG, W., SERVIN, B., SAYRE, B., ZHU, B., SWEENEY, D., MOORE, R., NIE, W., SHEN, Y., ZHAO, R., ZHANG, G., LI, J., FARAUT, T., WOMACK, J., ZHANG, Y., KIJAS, J., COCKETT, N., XU, X., ZHAO, S., WANG, J., and WANG, W.: Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nature Biotechnol.* 31, 135–141 (2013)
- DRÖGEMÜLLER, C., WÖHLKE, A., and DISTL, O.: Spider Lamb Syndrome (SLS) mutation frequency in German Suffolk sheep. *Anim. Genet.* 36, 539–540 (2005)

- GALLOWAY, S. M., McNATTY, K. P., CAMBRIDGE, L. M., LAITINEN, M. P., JUENDEL, J. L., JOKIRANTA, T. S., McLAREN, R. J., LUIRO, K., DODDS, K. G., MONTGOMERY, G. W., BEATTIE, A. E., DAVIS, G. H., and RITVOS, O.: Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genet.* 25, 279–283 (2000)
- GARIEPY, C. E., CASS, D. T., and YANAGISAWA, M.: Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 867–872 (1996)
- HOSODA, K., HAMMER, R. E., RICHARDSON, J. A., BAYNASH, A. G., CHEUNG, J. C., GIAID, A., and YANAGISAWA, M.: Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79, 1267–1276 (1994)
- IHARA, N., TAKASUGA, A., MIZOSHITA, K., TAKEDA, H., SUGIMOTO, M., MIZOGUCHI, Y., HIRANO, T., ITOH, T., WATANABE, T., REED, K. M., SNELLING, W. M., KAPPES, S. M., BEATTIE, C. W., BENNETT, G. L., and SUGIMOTO, Y.: A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res.* 14, 1987–1998 (2004)
- JOLLY, R. D., BLAIR, H. T., and JOHNSTONE, A. C.: Genetic disorders of sheep in New Zealand: a review and perspective. *N. Z. Vet. J.* 52 (2004)
- KIJAS, J. W., ORTIZ, J. S., McCULLOCH, R., JAMES, A., BRICE, B., SWAIN, B., TOSSER-KLOPP, G., and *International Goat Genome Consortium*: Genetic diversity and investigation of polledness in divergent goat populations using 52 088 SNPs. *Anim. Genet.* 44, 325–335 (2013)
- KNIPPERS, R.: Eine kurze Geschichte der Genetik. Berlin [u. a.]: Springer Spektrum 2012
- LÜHKEN, G.: Genetic testing for phenotype-causing variants in sheep and goats. *Mol. Cell. Probes* 26, 231–237 (2012)
- LÜHKEN, G., FLECK, K., PAUCIULLO, A., HUISINGA, M., and ERHARDT, G.: Familiar hypopigmentation syndrome in sheep associated with homozygous deletion of the entire endothelin type-B receptor gene. *PLoS One* 7, e53020 (2012)
- MADDOX, J. F.: A presentation of the differences between the sheep and goat genetic maps. *Genet. Sel. Evol.* 37, Suppl. 1, 1–10 (2005)
- MCCALLION, A. S., and CHAKRAVARTI, A.: EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II. *Pigment Cell Res.* 14, 161–169 (2001)
- METALLINOS, D. L., BOWLING, A. T., and RINE, J.: A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung disease. *Mamm. Genome* 9, 426–431 (1998)
- MONTGOMERY, G. W., LORD, E. A., PENTY, J. M., DODDS, K. G., BROAD, T. E., CAMBRIDGE, L., SUNDEN, S. L., STONE, R. T., and CRAWFORD, A. M.: The Booroola fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics* 22, 148–153 (1994)
- MULSANT, P., LECERF, F., FABRE, S., SCHIBLER, L., MONGET, P., LANNELUC, I., PISSELET, C., RIQUET, J., MONNIAUX, D., CALLEBAUT, I., CRIBIU, E., THIMONIER, J., TEYSSIER, J., BODIN, L., COGNIE, Y., CHITOUR, N., and ELSEN, J. M.: Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5104–5109 (2001)
- OMENN, G. S., and MCKUSICK, V. A.: The association of Waardenburg syndrome and Hirschsprung megacolon. *Amer. J. Med. Genet.* 3, 217–223 (1979)
- PAILHOX, E., VIGIER, B., CHAFFAUX, S., SERVEL, N., TAOURIT, S., FURET, J. P., FELLOUS, M., GROSCLAUDE, F., CRIBIU, E. P., COTINOT, C., and VAIMAN, D.: A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nature Genet.* 29, 453–458 (2001)
- PAILHOX, E., VIGIER, B., SCHIBLER, L., CRIBIU, E. P., COTINOT, C., and VAIMAN, D.: Positional cloning of the PIS mutation in goats and its impact on understanding mammalian sex-differentiation. *Genet. Sel. Evol.* 37, Suppl. 1, 55–64 (2005)
- PINGAULT, V., ENTE, D., DASTOT-LE MOAL, F., GOOSSENS, M., MARLIN, S., and BONDURAND, N.: Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum. Mutat.* 31, 391–406 (2010)
- SANTSCHI, E. M., PURDY, A. K., VALBERG, S. J., VROTSOS, P. D., KAESE, H., and MICKELSON, J. R.: Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mamm. Genome* 9, 306–309 (1998)
- SCHIBLER, L., CRIBIU, E. P., OUSTRY-VAIMAN, A., FURET, J. P., and VAIMAN, D.: Fine mapping suggests that the goat Polled Intersex Syndrome and the human Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Syndrome map to a 100-kb homologous region. *Genome Res.* 10, 311–318 (2000)
- SHAH, K. N., DALAL, S. J., DESAI, M. P., SHETH, P. N., JOSHI, N. C., and AMBANI, L. M.: White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: possible variant of Waardenburg syndrome. *J. Pediatr.* 99, 432–435 (1981)
- SILVA, B. D., CASTRO, E. A., SOUZA, C. J., PAIVA, S. R., SARTORI, R., FRANCO, M. M., AZEVEDO, H. C., SILVA, T. A., VIEIRA, A. M., NEVES, J. P., and MELO, E. O.: A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Anim. Genet.* 42, 89–92 (2011)



- SOUZA, C. J., MACDOUGALL, C., MACDOUGALL, C., CAMPBELL, B. K., MCNEILLY, A. S., and BAIRD, D. T.: The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. *J. Neuroendocrinol.* *169*, 1–6 (2001)
- TETENS, J., GANTER, M., MÜLLER, G., and DRÖGEMÜLLER, C.: Linkage mapping of ovine microphthalmia to chromosome 23, the sheep orthologue of human chromosome 18. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *48*, 3506–3515 (2007)
- The International Sheep Genomic Consortium*, ARCHIBALD, A. L., COCKETT, N. E., DALRYMPLE, B. P., FARAUT, T., KIJAS, J. W., MADDOX, J. F., McEWAN, J. C., HUTTON ODDY, V., RAADSMA, H. W., WADE, C., WANG, J., WANG, W., and XUN, X.: The sheep genome reference sequence: a work in progress. *Anim. Genet.* *41*, 449–453 (2010)
- VAGE, D. I., HUSDAL, M., KENT, M. P., KLEMETS DAL, G., and BOMAN, I. A.: A missense mutation in growth differentiation factor 9 (GDF9) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genet.* *14*, 1 (2013)
- WILSON, T., WU, X. Y., JUENGL, J. L., ROSS, I. K., LUMSDEN, J. M., LORD, E. A., DODDS, K. G., WALLING, G. A., McEWAN, J. C., O'CONNELL, A. R., McNATTY, K. P., and MONTGOMERY, G. W.: Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol. Reprod.* *64*, 1225–1235 (2001)
- YANG, G. C., CROAKER, D., ZHANG, A. L., MANGLICK, P., CARTMILL, T., and CASS, D.: A dinucleotide mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome (LWFS); a horse variant of Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1047–1052 (1998)

Prof. Dr. Gesine LÜHKEN  
Institut für Tierzucht und Haustiergenetik  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Ludwigstraße 21a  
35390 Gießen  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 641 9937680  
Fax: +49 641 9937689  
E-Mail: Gesine.Luehken@agr.uni-giessen.de

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

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

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

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

## Fellfarben beim Pferd – Mutationen und ihre pleiotropen Effekte

Monika REISSMANN (Berlin)

Mit 2 Tabellen

### *Zusammenfassung*

Die Vielfalt der Fellfarben wird von zahlreichen Züchtern gewünscht und gefördert. Für einige Farbmutationen konnte in den vergangenen Jahren die molekulare Grundlage gefunden werden. Aber jede Mutation stellt eine Veränderung des im Laufe der Evolution gebildeten Allelpool dar. Daher ist es nicht verwunderlich, dass einige Fellfarben mit krankhaften Veränderungen verknüpft sind. Die Grenzen zwischen gesund und krank sind jedoch bei Haustieren fließend, und manchmal entscheidet nur der Wunsch eines einzelnen Züchters darüber, ob eine Merkmalsvariante als krank oder akzeptabel angesehen wird.

Die Beziehung zwischen Fellfarbe und Erbdefekten kann auf klassischer Pleiotropie (ein Gen beeinflusst mehrere Merkmale), sekundären Effekten (Defekt ist die Folge eines farblichen Genotyps, aber nicht genetisch mit diesem verbunden) oder Kopplung (chromosomale Nähe der Mutationen für die Fellfarbe und den Defekt) beruhen. Die Auswirkungen reichen dabei von tödlich (*Lethal-white-foal-Syndrom*) über Behinderungen (Nachtblindheit, Taubheit) und verstärkter Anfälligkeit (Sonnenbrand) bis hin zu vermuteten, wenngleich noch nicht hinreichend bewiesenen Leistungsbeeinträchtigungen. Insgesamt gesehen stehen vor allem aufgehellte Fellfarben und Depigmentierungen mit körperlichen Einschränkungen in Verbindung.

Es ergibt sich die Frage, wie die Züchter damit umgehen sollten. Nur klare Regeln im Falle von Letalfaktoren (Verbot der Verpaarung von Heterozygoten), aber auch das kritische Beobachten der eigenen Zuchttiere können helfen, Schmerzen, Schäden und Leiden zu verhindern und in Konformität mit dem Tierschutzgesetz die farbliche Variabilität zu erhalten.

### *Abstract*

Many breeders desire and promote diversity of coat colours. Fortunately, the molecular basis of some colour mutations was found within the last years. But every mutation is a change of the allele pool established during the evolution. Therefore, it is not remarkable that several coat colours are also associated with pathological changes. In domestic animals, the frontier between health and illness is fluently. Sometimes only the wish of one breeder decides whether a trait variant is deemed to be sick or acceptable.

The relation between coat colour and hereditary defects can base on pleiotropic effects (one gene affect more than one trait), secondary effects (defects are the consequence of coat colour but not on genetic level) or linkage (mutations for coat colour and defect are situated near together on a chromosome). The effect can range from lethal (lethal white foal syndrome) over disablements (night blindness, deafness) and increased sensitivity (sunburn) to assumed although not sufficient proved performance reduction. At first, diluted coat colours and depigmentation are associated with constitutional restrictions.

How can breeders handle this problem? Prohibition of heterozygote mating (in case of lethal defects) but also critical evaluation of breeding animals can help to prevent pain, damage and distress and to receive the colour variability in conformance with the animal protection law.

## 1. Einleitung

Die riesige Variabilität der unterschiedlichen Fellfarben erfreut nicht erst seit heute die zahlreichen Züchter und Liebhaber des Pferdes. Einheitlich intensiv gefärbte Pferde finden dabei genauso begeisterte Reiter und Käufer wie kontrastreich gescheckte oder extrem aufgehellte Tiere. Besonders bei der wachsenden Gruppe der Freizeitreiter ist Exklusivität des Phänotyps hoch gefragt und wird dementsprechend gut bezahlt. Dies führt dazu, dass die Züchter immer wieder versuchen, durch entsprechende Anpaarungen völlig neue Farb- und Musterkombinationen zu erhalten oder durch die Einkreuzung von bisher in ihrer Rasse nicht vorhandener Farbballele zur Erhöhung der Verschiedenartigkeit ihrer eigenen Pferde beizutragen. Manchmal sind es auch nur der Spaß an der Farbzucht bzw. Experimentierfreude, die zu farblichen Anpaarungsversuchen führen.

Die genetische Grundlage für Fellfarben, die nicht der mehr oder weniger uniformen Wildfärbung entsprechen, sind Veränderungen in einem Allelpool, der sich im Verlauf der Evolution über einen langen Zeitraum gebildet hat. Die natürliche Selektion hat hierbei immer wieder regulierend alle Varianten mit nachteiligen Auswirkungen auf Gesundheit und Fitness eliminiert. Aktuelle Untersuchungen zeigen allerdings, dass auch bei den wild lebenden Vorfahren unserer Hauspferde bereits eine Reihe verschiedener Farbballele (wenngleich aufgrund ihres rezessiven Erbganges nicht immer phänotypisch sichtbar) vorhanden waren und damit nicht alle Pferde eine einheitlich braune/braunfalte Färbung aufwiesen. So konnte in über 13000 Jahre alten Knochen schon das Rappallel (*a*-Allel) nachgewiesen werden. Funde mit einem Alter von 6300 Jahren zeigen, dass einige Wildpferde auch schon über das Fox- (*e*)- bzw. über das Leopard-Komplex- (*LP*)-Allel in ihren Farbgenen verfügten (LUDWIG et al. 2009, PRUVOST et al. 2011). Mit der Haustierwerdung vor etwa 5000 Jahren konnte neben einem deutlichen Anstieg der Anzahl und der Diversität der gefundenen Farbballele auch eine erhöhte Farbvariabilität innerhalb von einzelnen Pferden nachgewiesen werden (LUDWIG et al. 2009). Dies bedeutet jedoch nicht, dass die vielfältigen Farbballele durch Mutationen erst zum Zeitpunkt der Domestikation neu entstanden sind. Vielmehr wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit durch unsere Vorfahren gezielt farblich besonders gezeichnete Pferde gesucht und vermehrt. Unter dem menschlichen Schutz sowie infolge ausgewählter Anpaarungen konnte sich dann die Allelfrequenz der Farbballele erhöhen.

Wie die zahlreichen unterschiedlichen Fellfarben entstehen Erbfehler – also genetisch bedingte pathologische Erscheinungen – ebenfalls durch Mutationen. Auf den ersten Blick scheinen die beiden genannten Merkmalsgruppen auch keine weiteren Gemeinsamkeiten aufzuweisen. Während die Farbvielfalt meist gewünscht und beliebt ist, definieren sich Erbfehler darüber, dass sie Defekte hervorrufen und so mit Schmerzen, Leiden oder gar dem Tod des betroffenen Tieres in Beziehung stehen. Bei den Letalfaktoren sterben die Tiere sogar noch vor dem Erreichen der Geschlechtsreife und ziehen so einen beachtlichen Verlust nach sich. Von den Züchtern werden Erbdefekte daher überwiegend als negative Erscheinung bekämpft. Aber die Grenzen zwischen gesund und krank sind gerade bei unseren Haustieren fließend. Es stellt sich immer wieder die Frage, ab welchem Punkt ein Tier als krank zu bezeichnen ist und ob es überhaupt Tiere ohne fehlerhafte Anlagen gibt. Manchmal entscheidet nur der Wunsch eines einzelnen Züchters darüber, ob eine Merkmalsvariante als krank und nachteilig oder als akzeptabel und sogar wertvoll angesehen wird. Beispielsweise stellen die Weißisabellen (doppelt aufgehellte Isabellen – Cremellos, Perlinos und

Smoky creams) eine von verschiedenen Farbzüchtern oft begehrte Besonderheit für eine sichere Farbvererbung (Produktion von Isabellen – Palominos und Buckskins) dar, während sie von anderen abfällig und geringschätzig als überempfindliche Pferde behandelt werden. Selbst Graf KINSKÝ, der Begründer der bekannten isabellfarbenen Kinský-Pferdezucht, soll sie verächtlich Kakerlaken genannt haben. Im 18. Jahrhundert erhielten diese Bezeichnung des Öfteren auch die Weißgeborenen des Gestüts Herrenhausen, da sie überwiegend als lichtscheue und daher schwierig zu handhabende Pferde galten (MEYER und MEYER 2002). Aber die Bewertung einer Fellfarbe ist nicht nur eine Frage des Geschmacks eines Züchters. Die Fellfarbe kann über direkte oder indirekte Wege mit deutlichen Erbfehlern und dadurch mit erheblichen Einschränkungen für das Pferd verbunden sein. Aus diesem Grund ist es erforderlich, sowohl die genetischen Grundlagen der Farbbildung und der Entstehung von Erbfehlern als auch die mögliche Basis für Beziehungen zwischen beiden Merkmalen näher zu betrachten.

## 2. Molekulargenetische Basis der Fellfarben beim Pferd

Die Fellfarben der Säugetiere werden grundsätzlich nur durch zwei Pigmentgruppen, die Eumelanine (schwarzbraune bis schwarze Pigmente) und die Phäomelanine (gelbbraune bis rotbraune Pigmente), hervorgerufen. Allerdings konnten bis heute bei der Maus ungefähr 380 Loci ermittelt werden, die durch einen modifizierenden Einfluss auf die Farbbildung die bekannte riesige Variabilität des Haarkleides hervorrufen (MONTOLIU et al. 2013). Die Wirkung dieser zahlreichen Loci äußert sich vor allem in zwei hinsichtlich ihrer Ursache und Auswirkung recht unterschiedlichen Formen. So kann es auf der einen Seite durch eine veränderte Genwirkung zur Umgestaltung der Pigmentbildung innerhalb der Melanozyten selbst kommen, was dann je nach Gen eine Verstärkung (Melanismus) oder Verdünnung der Farbproduktion (bis zum Albino) zur Folge hat. Auf der anderen Seite kommt es durch eine Veränderung bei der Melanozytenbildung, ihrer Wanderung in den Geweben oder ihrem Überleben zum Fehlen von Farbzellen in bestimmten Körperbereichen. Die Folge sind weiße Haarbereiche über einer rosafarbenen Haut (leuzistische Bereiche). Dieser Effekt kann sich im Extremfall auf den gesamten Körper erstrecken, so dass ein völlig pigmentloses, also weißes Tier entsteht.

Wenngleich die Erkenntnisse beim Pferd noch nicht so weit wie bei der Maus gediehen sind, konnte für die wichtigsten Fellfarben die genetische Basis bereits aufgedeckt werden (Tab. 1). Die Ära der molekularen Farbbestimmung begann im Jahr 1996 mit der Entdeckung des Foxallels (*e*-Allel), welches durch eine Mutation im *MC1R*-(*Melanocortin-1 Receptor*)-Gen codiert wird (MARKLUND et al 1996). Diese Mutation, die durch einen Einzelbasenaustausch (C>T) zu einer Aminosäureveränderung von Serin zu Phenylalanin (Ser83Phe) führt, zerstört die Funktionsfähigkeit des Rezeptors. Der defekte Rezeptor ist nicht mehr in der Lage, die Produktion von schwarzem Eumelanin zu stimulieren, so dass die Farbproduktion auf die Bildung des gelbroten Phäomelanins umschaltet. Damit entscheidet das *MC1R*-Gen grundsätzlich darüber, welches der beiden Grundpigmente bei einem Pferd gebildet wird. Das rezessive Foxallel (*e*-Allel) ist dabei für die gelbrötliche Fellfarbe des Fuchses verantwortlich, während das dominante *E*-Allel die Schwarzträger hervorbringt.

Tab. 1 Molekulargenetisch identifizierte Mutationen mit Einfluss auf die Fellfarbe beim Pferd

Farbwirkung	Gen	Genotypen und Phänotypen			
Grundfarben	<i>MC1R</i>	<i>EE</i>	<i>Ee</i>	<i>ee</i>	
		Schwarzträger	Schwarzträger	Fuchs	
	<i>ASIP</i>	<i>AA</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>	
		Braune bei E-Allel	Braune bei E-Allel	Rappe bei E-Allel	
Aufhellungen	<i>SLC45A2</i>	<i>CC</i>	<i>Cc<sup>cr</sup></i>	<i>c<sup>cr</sup>c<sup>cr</sup></i>	
		Vollfarbig	Isabell	Weißisabell	
		<i>PRLPRL</i>	<i>PRLprl</i>	<i>prlprl</i>	
			Vollfarbig	Vollfarbig	Pearlfarben
	<i>SLC36A1</i>	<i>CHCH</i>	<i>CHch</i>	<i>chch</i>	
		Champagner	Champagner	Vollfarbig	
	<i>Pmel17</i>	<i>ZZ</i>	<i>Zz</i>	<i>zz</i>	
		Silberfarben	Silberfarben	Vollfarbig	
	<i>MYO5A</i>	<i>MYO5A<sup>del</sup>MYO5A<sup>del</sup></i>	<i>MYO5A<sup>+</sup>MYO5A<sup>del</sup></i>	<i>MYO5A<sup>+</sup>MYO5A<sup>+</sup></i>	
		Lavender foal	Vollfarbig	Vollfarbig	
Scheckmuster	<i>KIT</i>	<i>TOTO</i>	<i>Toto</i>	<i>toto</i>	
		Tobiano	Tobiano	Solide	
		<i>SB1SB1</i>	<i>SB1sb1</i>	<i>sb1sb1</i>	
		Weißsabino	Sabino	Solide	
		<i>W1W1</i> bis <i>W20W20</i>	<i>W1w1</i> bis <i>W20w20</i>	<i>w1w1</i> bis <i>w20w20</i>	
		Weißgeborene/Sabino-ähnliche, letal?	Weißgeborene/ Sabinoähnliche	Solide	
	<i>EDNRB</i>	<i>OVOV</i>	<i>OVov</i>	<i>ovov</i>	
		Lethal white foal	Overo	Solide	
	<i>TRPM1</i>	<i>LPLP</i>	<i>LPlp</i>	<i>lplp</i>	
		Tiger (Few spotted)	Tigerschecke	Solide	
	<i>MITF</i>	<i>SW1SW1, SW3SW3</i>	<i>SW1sw1, SW3sw3</i>	<i>sw1sw1, sw3sw3</i>	
		Splashed white	Splashed white	Solide	
		<i>MITF<sup>N310S</sup>MITF<sup>N310S</sup></i>	<i>MITF<sup>N310S</sup>MITF<sup>+</sup></i>	<i>MITF<sup>+</sup>MITF<sup>+</sup></i>	
		Unbekannt	Macchiato	Solide	
	<i>PAX3</i>	<i>SW2SW2</i>	<i>SW2sw2</i>	<i>sw2sw2</i>	
		Splashed white	Splashed white	Solide	
Schimmel	<i>STX17</i>	<i>GG</i>	<i>Gg</i>	<i>gg</i>	
		Schimmel	Schimmel	Nichtschimmel	

Besitzt ein Pferd durch einen intakten MC1-Rezeptor grundsätzlich die Fähigkeit, schwarzes Eumelanin zu synthetisieren, kann die Verteilung dieses Pigmentes am Körper durch die Wirkung eines zweiten Gens, des *ASIP*- (*Agouti Signalling Protein*)-Gens, modifiziert oder besser gesagt auf bestimmte Körperbereiche beschränkt werden. Das dominante A-Allel dieses Gens bildet ein regional wirkendes Protein, welches den MC1-Rezeptor blockiert und damit die Eumelaninproduktion ähnlich wie bei einem defekten Rezeptor verhindert. Da dieses Protein jedoch nur direkt an seinem Bildungsort wirksam wird, kann bei einem Pferd mit intaktem MC1-Rezeptor sowohl schwarzes Eumelanin als auch gelbrotes Phäomelanin entstehen. Dabei

färben sich zuerst besonders die Flanken, der Bauch sowie der Nüsternbereich und bei stärkerer Ausweitung der Agoutiproteinwirkung der gesamte Hals und Rumpf gelblich, während das Langhaar und die Beine immer schwarz bleiben. Derartig gefärbte Pferde werden als Braune bezeichnet. Durch eine Deletion von 11 Basenpaaren im zweiten Exon verliert das Agoutiprotein seine Fähigkeit zur Rezeptorblockade. Am gesamten Körper des Pferdes kann Eumelanin gebildet werden, und es entsteht durch den Einfluss dieses rezessiven *a*-Allels in homozygotem Zustand ein Rappe (RIEDER et al. 2001). Rappe, Brauner und Fuchs verkörpern die drei Grundfarben des Pferdes, die durch die unterschiedliche Allelausstattung in den beiden Genen *MC1R* und *ASIP* immer alternativ auftreten.

Wie bereits erwähnt, existieren zahlreiche Gene, die, durch ihren Einfluss auf die Bildung und den Transport der Farbpigmente in die wachsenden Haare, eine Modifikation im farblichen Erscheinungsbild der Grundpigmente und so vielfältige Abstufungen in der Färbung des Haarkleides hervorrufen können. Beim Pferd überwiegen hier die Prozesse der Farbverdünnung, die zu aufgehellten Fellfarben führen. Allerdings kann die Wirkung auf das Deckhaar anders als die auf das Langhaar ausfallen. Einige Mutationen, die einen pigmentreduzierenden Einfluss besitzen, wurden bereits für das Pferd identifiziert.

Das wohl bekannteste Aufhellungsgen ist das *SLC45A2*-(*Solute Carrier Family 45, Member 2*)-Gen, oft besser als *MATP*-(*Membranassoziertes Transportprotein*)-Gen bekannt. Durch eine Transition (G>A) im Exon 2 entsteht das verdünnende Cremeallel (*c<sup>cr</sup>*-Allel), das im heterozygoten Zustand durch die vorrangige Aufhellung des Phäomelanins aus Braunen und Füchsen die Braun- und Fuchsisabellen hervorbringt (MARIAT et al. 2003). Bei den Rappen ist der pigmentverdünnende Einfluss nur äußerst gering und wird daher oft übersehen. Beim homozygoten Vorliegen des Cremeallels erfasst die Farbverdünnung jedoch beide Pigmentarten gleichermaßen. Dadurch entstehen aus den drei Grundfarben die nur noch gering pigmentierten und daher gleichermaßen sehr hellen Weißisabellen mit rosafarbener Haut und meist blauen Augen.

Anders gestaltet sich die Farbverdünnung beim *Pmel17*-(*Premelanosome Protein 17*)-Gen, auch *SILV*-Gen genannt, das nur das schwarze Eumelanin aufhellt und so bei Rappen und Braunen zum Phänotyp des Silberfarbenen führt. Hier ist eine Punktmutation (C>T) im Exon 11 für die Entstehung des Silberallels (*Z*-Allels) verantwortlich (BRUNBERG et al. 2006, REISSMANN et al. 2007).

Wenngleich schon einige weitere Mutationen für Aufhellungen wie Pearl (*SLC45A2*-*Solute Carrier Family 45, Member 2*-Gen), Champagner (*SLC36A1*-*Solute Carrier Family 36, Member 1*-Gen) oder auch Lavender-Fohlen (*MYO5A*-*Myosin VA*-Gen) gefunden wurden (BELLONE 2010, BROOKS et al. 2010, COOK et al. 2008), ist hier noch erheblicher Forschungsbedarf vorhanden, da die Kenntnisse über kausale Mutationen für zahlreiche andere Verdünnungen (z. B. für Falb- oder Pangaréaufhellung) noch fehlen.

Zu den leuzistisch wirkenden Genen, die zu pigmentlosen Bereichen im Fell und über das Nebeneinander von farbigen und pigmentlosen Haaren zu Farbmustern (Scheckungsformen) führen, zählt vor allem das *KIT*-(*V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog*)-Gen, das vorrangig in Prozesse der Melanozytenmigration in die Gewebe und ihr Überleben am Wirkungsort eingreift. Auf den zahlreichen in diesem Gen gefundenen Mutationen beruhen diverse Scheckungsformen, zu denen die Tobiano-Scheckung, verschiedene Varianten von sabinoähnlichen Mustern sowie die Weißgeborenen zählen (BROOKS und BAILEY 2005, BROOKS et al. 2002, HAASE et al. 2007, 2008, 2009, HAUSWIRTH et al. 2013).

Während der Embryonalphase übernimmt das *EDNRB*-(*Endothelin Receptor Type B*)-Gen eine entscheidende Aufgabe für die Differenzierung von Stammzellen in Melanoblasten, die



Vorstufen der Melanozyten, und ist damit in seiner Wirkung noch vor dem *KIT*-Gen angesiedelt. Der Austausch der Aminosäure Isoleucin durch Lysin (Ile118Lys) wegen einer Dinukleotidmutation im Endothelinrezeptor ruft eine Störung in der Farbzeldifferenzierung hervor, in deren Folge im heterozygoten Vorkommen nicht mehr alle Hautbereiche von Melanozyten besiedelt werden und die bekannten Overo-Schecken entstehen. Liegt das Overoallel (*OV*-Allele) homozygot vor, besitzen die Fohlen generell keine Farbzellen mehr und haben daher ein pigmentloses Fell, rosafarbene Haut sowie helle Augen und Hufe (METALLINOS et al. 1998, SANTOSCHI et al. 1998).

Scheckmuster werden weiterhin durch Mutationen im *TRPM1*-(*Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily M, Member 1*)-Gen in Form des Leopard-Komplexes (BELLONE et al. 2008) sowie in den Genen *MITF* (*Microphthalmia-associated Transcription Factor*) und *PAX3* (*Paired Box 3*) als Splashed-white-Varianten hervorgerufen (HAUSWIRTH et al. 2012, 2013). Aber auch der molekulargenetische Hintergrund zahlreicher Scheckungen liegt noch im Dunklen.

Unabhängig von der Grundfarbe, deren Aufhellung und dem vorliegenden Scheckungsmuster kann es zu einem vorzeitigen progressiven Ergrauen der Fellfarbe kommen. Dieses Phänomen, das eigentlich keine Farbe, sondern nur die zunehmende Abwesenheit von Farbpigment in den Haaren darstellt, wird beim Pferd als Schimmel bezeichnet. Die Mutation für die Schimmelung wurde in Form einer 4,6-kb-Duplikation im Intron 6 des *STX17*-(*Syntaxin 17*)-Gens gefunden (ROSENGREN PIELBERG et al. 2008).

### 3. Grundlagen für die Beziehung zwischen Fellfarbe und Erbfehlern

Die möglichen Auswirkungen, die die verschiedenen Fellfarben auf andere Merkmale besitzen könnten, wurden und werden schon seit Jahrhunderten von den Züchtern, Reitern, farbbegeisterten Pferdefreunden und Wissenschaftlern in den unterschiedlichsten Regionen der Welt kontrovers diskutiert. Die Befürwortungen eines solchen Zusammenhangs reichen von der pauschalen Zuordnung verschiedener Eigenschaften zu bestimmten Fellfarben im Rahmen von Legenden, Prosa und Vermutungen (FORBIS 1980, beim Arabischen Vollblut) bis hin zu Erfahrungsberichten (KEELER 1947) und exakten Untersuchungen (DRING et al. 1981). Demgegenüber stehen vor allem die Sportreiter und Nutzer von Arbeitspferden, die eher die schon von WRANGEL (1928) geäußerte Meinung vertreten, dass ein gutes Pferd keine schlechte Farbe hat. Auch in jüngster Zeit haben sich Autoren mit dieser Problematik befasst und Ergebnisse aus verschiedenen wissenschaftlichen Untersuchungen zusammengetragen (BELLONE 2010, REISSMANN und LUDWIG 2013). Allerdings konnten bisher nur verhältnismäßig wenige Zusammenhänge wirklich eindeutig nachgewiesen werden, und viele Vermutungen erfordern noch eine exakte wissenschaftliche Überprüfung. Für die genaue Aufdeckung echter Zusammenhänge ist es erforderlich, zunächst nach der möglichen Basis für derartige Beziehungen zu suchen.

Bei einer grundsätzlichen Betrachtung lässt sich feststellen, dass viele Farbmutationen – speziell verschiedene Formen von Aufhellungen und Depigmentierungen – zumindest auf den ersten Blick mit auch anderweitig, oft krankhaft veränderten Phänotypen verbunden sind (Tab. 2). Derartige Beziehungen wurden schon früher, als es noch keine so umfassende Kenntnisse der biochemischen und molekularen Grundlagen gab, von Züchtern, Reitern und Pferdefreunden beobachtet. So galten bei den Arabern sowohl aufgehellte und stark verwaschene Farben

als auch große weiße Haarstellen an Kopf, Körper und Beinen als Ausdruck für mangelnde Gesundheit und Degeneration eines Pferdes (FORBIS 1980). In gleicher Weise äußert sich WRANGEL (1928), der durch die Praxis überwiegend bestätigt sieht, dass blasse Fellfarben und helle Hufe mit mangelnder Leistungsfähigkeit in Verbindung stehen. Das unterstreicht, dass Farbe – sprich Pigment – für verschiedene Lebensprozesse essentiell zu sein scheint bzw. dass für die Entstehung von Farbpigmenten Schlüsselenzyme verantwortlich sind, die gleichermaßen auch in anderen Stoffwechselprozessen wirken.

Tab. 2 Übersicht über ein bereits beschriebenes gemeinsames Auftreten von Fellfarben und erblichen Defekten. (Nicht alle hier aufgeführten Fellfarben sind nachgewiesenermaßen über klassische Pleiotropie mit den beobachteten Erkrankungen verbunden. Es ist daher durchaus möglich, dass Pferde zwar die genannte Fellfarbe, jedoch nicht den Defekt aufweisen.)

Fellfarbe	Gen	Allel	Beobachtete Erkrankungen
Dominant Weiß Große weiße Kopfabzeichen bei Splashed white	<i>KIT</i>	<i>W1</i>	Homozygot: wahrscheinlich letal
Lavender	<i>MITF, PAX3</i>	<i>SW1-SW3</i>	Hörprobleme bzw. Taubheit
Macciato	<i>MYO5A</i>	<i>MYO5A<sup>del</sup></i>	Homozygot: letal (LFS)
Overoscheckung	<i>MITF</i>	<i>MITF<sup>N3105</sup></i>	Taubheit, geringe Spermamotilität
Schimmel	<i>EDNRB</i>	<i>OV</i>	Homozygot: letal (LWFS)
Silberfarbe	<i>STX17</i>	<i>G</i>	Melanome, Vitiligo (verstärkt bei Homozygoten)
	<i>Pmel17</i>	<i>Z</i>	Heterozygot: Augenzysten Homozygot: Augenveränderungen (MCOA)
Stichelhaarig (Roan)	<i>KIT?</i>	<i>RN</i>	Homozygot: eventuell bei einigen Formen letal
Tigerscheckung	<i>TRPM1</i>	<i>LP</i>	Homozygot: Nachtblindheit (CSNB)
Weißisabell	<i>SLC45A2</i>	<i>c<sup>cr</sup></i>	Homozygot: bei einigen Pferden verstärkte Lichtempfindlichkeit
Weißsabino	<i>KIT</i>	<i>SBI</i>	Homozygot: bei einigen Pferden/Rassen erhöhte Lichtempfindlichkeit

Bei den Ebenen, auf denen Fellfarben mit verschiedenen Defekten in Beziehung stehen können, wird unterschieden zwischen:

- klassischer Pleiotropie, bei der ein Gen mehrere Merkmale gleichzeitig beeinflusst;
- sekundärem Effekt (unechter Pleiotropie), der zwar als Folge eines bestimmten farblichen Phänotyps auftritt, mit diesem aber nicht auf der genetischen Ebene verbunden ist; und
- Merkmalsassoziation infolge einer chromosomalen Nähe oder eines Founder-(Linien)-Effekts. Die Farbe wirkt hier lediglich als Marker für eine Erkrankung.

Erst mit der Aufdeckung der molekulargenetischen Grundlagen für die verschiedenen farblichen Phänotypen wurde es möglich, tiefer in die Zusammenhänge zwischen Fellfarbe und anderen Merkmalen einzudringen. Damit gelang es erstmalig nachzuweisen, ob eine vermutete pleiotrope Beziehung wirklich auf ein und derselben Mutation beruht oder ob andere Mechanismen für diesen Zusammenhang verantwortlich sind und eine Verbindung nur vorgetäuscht ist. Besonders für die züchterischen Entscheidungen ist es wichtig zu wissen, welche der drei genannten Beziehungen jeweils vorliegt, um mit ihren Zuchtprogrammen und Selektionsentscheidungen darauf richtig reagieren zu können.

### 3.1 *Lethal-white-foal-Syndrom (LWFS) und Overoscheckung*

Ein Paradebeispiel für die klassische Pleiotropie stellt das *Lethal-white-foal-Syndrom* dar. Hierbei handelt es sich um einen Letalfaktor, der auf molekularer Ebene direkt mit einer vollkommen weißen Fellfarbe verbunden ist. Wie bereits weiter oben erläutert, steuert der Endothelinrezeptor B (EDNRB) während der embryonalen Entwicklung die Differenzierung der Melanoblasten aus den Stammzellen der Neuralleiste. Die Overomutation (*OV*-Allel), die im homozygoten Zustand durch das vollständige Fehlen von Melanozyten Fohlen mit unpigmentiertem Fell und rosafarbener Haut zur Folge hat, zeigt jedoch noch weitere Auswirkungen auf den Organismus. Da der Rezeptor unter anderem für die Differenzierung von Nervenzellpopulationen verantwortlich ist, treten bei seinem Ausfall auch Störungen bei diesen Zellentwicklungen auf. Durch die fehlende Rezeptorwirkung werden keine Ganglien im Darm (intestinale Aganglionose) ausgebildet, und es entsteht ein sogenanntes tödliches Megacolon, bei dem die Nahrung infolge fehlender Peristaltik nicht den Darm passieren kann. Die Fohlen sterben letztendlich an einer inneren Vergiftung (METALLINOS et al. 1998, SANTSCHI et al. 1998, 2001, YANG et al. 1998). Hier liegt damit die klassische Form der Pleiotropie vor. Eine Mutation in einem Gen (hier das *EDNRB*-Gen) beeinflusst über gleiche Reaktionswege zwei sehr unterschiedliche Merkmale – die Fellfarbe und die Innervation des Darmes.

Ein verantwortungsbewusster Züchter würde normalerweise konsequent gegen solch einen schwerwiegenden tödlichen Erbfehler selektieren. Aber das Vorhandensein nur eines Overoallels beeinflusst nicht oder zumindest nicht sichtbar die Innervation des Darmes. Es führt jedoch infolge des vollständigen oder teilweisen Fehlens von Melanozyten in bestimmten Hautbereichen (besonders am Kopf, am Hals und am seitlichen Rumpf) zu weißen Fellstellen und damit zu einer interessanten Musterung des Fells. Diese heterozygoten Träger des mutierten *OV*-Allels sind die beliebten und begehrten Overoschecken. Der einzige Weg, der aus dieser Misere führt, ist das grundsätzliche Verbot der Verpaarung von zwei heterozygoten Pferden, wie es in einem solchen Fall das deutsche Tierschutzgesetz fordert. Dies ließe sich aufgrund des vorhandenen direkten Gentests (eindeutiger Nachweis des *OV*-Alleles) auch in Zweifelsfällen leicht umsetzen. Aber seitens der Zuchtverbände gibt es vielfach nur Empfehlungen zum Ausschluss von Heterozygotenanpaarungen und keinerlei Restriktionen, die eine weitere Verbreitung des Overoallels in andere Rassen einschränken.

Ursprünglich scheint diese Form der Scheckung nur beim Paint Horse vorhanden gewesen zu sein. Das LWF-Syndrom stellte damit ein begrenztes Problem innerhalb einer Rasse dar. Die Paint-Horse-Züchter kennen mittlerweile diese Erkrankung recht gut und sind um einen ordentlichen Umgang mit dem *OV*-Allel zumindest bemüht. Aber in den letzten Jahren versuchten Züchter immer wieder, diese für sie interessant erscheinende Musterung auch in ihre eigenen Rassen neu einzukreuzen. Besonders wenn die entstehenden Pferde rassebedingt nicht ganz typische Overomuster aufweisen und die Züchter dieser Rassen die Allelwirkung nur unzureichend kennen, kann der Erbfehler schnell unkontrolliert weitergetragen werden.

### 3.2 *Lavender-foal-Syndrom (LFS)*

Beim *Lavender-foal-Syndrom*, einem klar rezessiven Erbdefekt bei Arabischen Vollblutpferden, sind die neugeborenen Fohlen aufgrund komplexer neurologischer Störungen (Opisthotonus oder Nystagmus) nicht in der Lage aufzustehen und zu saugen. Sie versterben daher meist kurz nach ihrer Geburt. Interessanterweise verfügen sie gleichzeitig über eine blassgraue

bis hellgelbbraune Fellfärbung. Die heterozygoten Anlageträger sind in jeder Hinsicht unauffällig. Als Ursache für die Erkrankung, aber auch der aufgehellten Farbe wird eine Frameshift-Mutation im Exon 30 des *MYO5A*-Gens auf dem equinen Chromosom 1 angenommen (BROOKS et al. 2010, GABRESKI et al. 2012). Da die Fohlen nicht lebensfähig sind, ist die Färbung züchterisch nicht von Belang. Es sollte auf alle Fälle die Anpaarung von heterozygoten Trägern vermieden werden bzw. eine direkte Selektion gegen das Allel in Betracht gezogen werden.

### 3.3 Multiple Congenital Ocular Anomalies (MCOA) und Silberaufhellung

Ein weiterer Zusammenhang zwischen Fellfarbe und einer erblich bedingten Erkrankung liegt bei der Silberfarbe und markanten Augenveränderungen (*Multiple Congenital Ocular Anomalies* – MCOA) vor. Zunächst wurden diese Augenerkrankungen bei silberfarbenen Rocky Mountain Horses festgestellt. Eine genauere Pedigree-Analyse zeigte, dass sowohl bei den Pferden mit Erkrankungen als auch bei denen mit Silberfarbe die gemeinsame Abstammung eine große Rolle spielt (GRAHN et al. 2008). Daher wurde von einigen Züchtern zunächst vermutet, dass die Augenveränderungen aufgrund der relativ engen Blutführung beim Rocky Mountain Horse durch eine Kopplung von Erkrankungsursache und Silbermutation über einen Linienbegründer hervorgerufen werden. Schnell zeigte sich aber, dass die Ursachen für beide Erscheinungen im gleichen Bereich des equinen Chromosoms 6 (Region des *Pmel17*-Gens) mappen, also ihre jeweils kausalen Mutationen sehr dicht nebeneinander liegen müssen bzw. es sich wahrscheinlich nur um eine Mutation handelt. Dabei weisen für das Silberallel (*Z*-Allel) heterozygote Tiere überwiegend Zysten auf, während homozygote Pferde den MCOA-Phänotyp besitzen (ANDERSSON et al. 2008, 2011b). Da inzwischen auch beim Islandpony (ANDERSSON et al. 2011a) und in einer eigenen Analyse beim Comtois eine Beziehung zwischen Fellfarbe und MCOA gefunden wurde (zwei homozygote Silberfarbene wiesen deutlich komplexe Augenveränderungen auf), scheint auch hier ein klassischer pleiotroper Effekt vorzuliegen.

Allerdings gibt es Hinweise auf homozygote silberfarbene Pferde, bei denen unter Umständen keine MCOA vorliegt. Sollte sich das bewahrheiten, könnte es sich hier um ein Gen mit unvollständiger Penetranz handeln. Möglicherweise ist die Silbermutation im *Pmel17*-Gen zwar eine wichtige und notwendige Voraussetzung für die multiplen Augenveränderungen, ihr letztendliches Auftreten wird aber durch weitere Gene modifiziert.

Für eine Zucht auf Silberfarbe, wie sie in einigen Rassen zur Diskussion steht, ist eine Aufklärung dieses Zusammenhanges von enormer Bedeutung. Sollten die MCOA ausschließlich mit der Silbermutation assoziiert sein, wäre eine Zucht auf Farbe ohne das gleichzeitige Vorhandensein von Augenveränderungen und deren weitere Verbreitung im Bestand unmöglich. Damit stellt sich für die Zucht die Frage, wie problematisch Augenzysten und komplexe Augenveränderungen für ein Pferd sind. So dramatische Folgen wie beim LWF-Syndrom treten hier nicht auf, und Schmerzen scheinen die Augenanomalien nicht zu bereiten. Aber infolge der geweckten Aufmerksamkeit für diese Erkrankung und der genaueren Beobachtung der Pferde berichten verschiedene Züchter, dass reinerbige Silberfarbene mit Augenveränderungen nervöser und schreckhafter erscheinen. Dies ließe sich dadurch erklären, dass diese Pferde aufgrund der Zysten ihre Umgebung schlechter wahrnehmen. Für den Fall, dass die MCOA erst durch das Zusammenwirken mit weiteren Genen entstünden, wäre unter Umständen eine reine Farbzucht mit gesunden Augen möglich. Hier sind dringend weitere Untersuchungen an einem umfangreichen Tiermaterial notwendig.

### 3.4 Nachtblindheit (CSNB) und Tigerscheckung

Ganz ähnlich wie im Falle der MCOA stellt sich die Selektionsfrage bei der erblich bedingten Nachtblindheit, wie sie bei reinerbigen Tigerschecken auftritt (BELLONE et al. 2008). Auch hier scheint die Mutation im *TRPM1*-Gen, die mit der Tigerscheckung assoziiert ist, ebenso für die Nachtblindheit verantwortlich zu sein. Erstaunlicherweise konnte das Leopard-Allel (*LP*-Allel) bereits bei pleistozänen Wildpferden nachgewiesen werden. Nachtblindheit war mit Sicherheit ein negativer Selektionsfaktor für die betroffenen Wildpferde. Die gesunden, mischerbigen Tigerschecken besaßen während der Eiszeit möglicherweise einen Vorteil, da ihre speziell gemusterte Fellfärbung eine optimale Tarnung in dieser Umwelt darstellte (PRUVOST et al. 2011).

### 3.5 Erbliche sensorineurale Taubheit (CSD) und große weiße Kopfabzeichen

Obwohl sich die Beziehung zwischen extrem großen weißen Kopfabzeichen, die meist die Ohren erreichen, und erblicher sensorineuraler Taubheit etwas anders als die bisher angeführten Beispiele gestaltet, gehört sie grundsätzlich ebenfalls in die Kategorie der klassischen Pleiotropie.

Beim Hörvorgang treffen die Schallwellen als mechanische Reize in der im Innenohr befindlichen Schnecke (Cochlea) auf eine von Haarzellen gebildete Oberfläche. Diese Haarzellen nehmen die Schwingungen auf und wandeln sie in elektrische Nervenreize um. Fehlen jedoch die Melanozyten und damit das Pigment in diesen Haarzellen, kann die Schwingungsumwandlung nicht stattfinden und die Reizweiterleitung ist unterbrochen. Wenngleich der genaue Vorgang noch nicht vollständig bekannt ist, kommt es durch den Pigmentmangel möglicherweise zu einer verminderten Blutversorgung und damit zu einer Degeneration der Schneckeninnenwandungen. Der im Innern gebildete Hohlraum fällt in sich zusammen, und die auf der Oberfläche befindlichen Sinneszellen sterben ab (STRAIN 1996).

Alle Gene, die die Differenzierung, die Migration und/oder das Überleben von Melanozyten beeinflussen, können damit auch die gemeinsame genetische Ursache für diese Art des Zusammentreffens von unpigmentierter Fellfarbe und vererbter, also kongenitaler Taubheit sein (RAK und DISTL 2005). So ist das relativ häufige Zusammentreffen von blauen Augen bzw. unpigmentiertem Haar auf rosafarbener Haut und dem Verlust des Gehörs bei verschiedenen Tierarten nicht verwunderlich (FAMULA et al. 2000, JURASCHKO et al. 2003a, b). Allerdings scheint es verschiedene Formen dieser Taubheit zu geben, was aufgrund der Vielzahl der infrage kommenden Gene nicht überraschend ist. Neben den völlig weißen Pferden mit LWFS und gelegentlich auch den Overoschecken (MAGDESIAN et al. 2009) sind besonders unter den Pferden mit extremer Splashed-white-Musterung, bei denen die Weißfärbung große Teile des Kopfes einnimmt, taube Pferde zu finden. Vor allem die in den Genen *MITF* und *PAX3* gefundenen Mutationen erklären bei zahlreichen Pferden die Weißzeichnung und scheinen in Fällen mit extremer Weißzeichnung auch für die Taubheit verantwortlich zu sein (HAUSWIRTH et al. 2012). Hier offenbart sich der besondere Charakter dieser Pleiotropiebeziehung. Mutationen in den genannten Genen sind zwar grundsätzlich für die Taubheit verantwortlich, weil es generelle Störungen in der Wanderung der Farbzellen gibt. Ob die Melanozyten aber das Ohr erreichen oder nicht, wird von anderen Genen modifiziert bzw. durch die äußeren Einflüsse mitbestimmt. Ähnlich ist die Situation bei anderen Tierarten wie beispielsweise weißen oder stark weiß gemusterten Hunden (vor allem Doggen und den beliebten Dalmatinern)

und weißen Katzen. So gibt es Formen der Taubheit, die sich bei Hunden erst in den ersten drei bis vier Lebenswochen manifestieren, da die Degeneration der Sinneszellen nach der Geburt allmählich voranschreitet (STRAIN 1999).

Auch in diesem Fall stellt sich wie bei den Augenerkrankungen die Frage nach dem Grad und der Schwere der Behinderung für das Pferd. Die Taubheit ist wahrscheinlich völlig schmerzfrei. Da das Pferd in der Obhut des Menschen gehalten wird und damit vor Raubtieren und Gefährdungen weitgehend geschützt ist, sind keine negativen Einflüsse auf seine Überlebenschancen zu erwarten. Es gibt Reiter, die sogar die Meinung vertreten, dass taube Pferde besonders gut für Turniere geeignet sind, da sie sich nicht durch die Geräuschkulisse ablenken lassen. So gibt es bisher beim Pferd – im Gegensatz zum Hund – keine Hinweise oder Auflagen bei der Zucht mit tauben Tieren. Weiterführende Untersuchungen sollten unbedingt angestellt werden, um einerseits die wirkliche Beeinträchtigung näher zu ergründen und andererseits die jeweilige Ursache der Taubheit aufzudecken. Erst dann ist es möglich, genauere Empfehlungen für die Zucht mit derartigen Farbvarianten zu geben.

### *3.6 Sekundäre Effekte eines hellen Fells über rosafarbener Haut*

Neben der beschriebenen Taubheit lassen sich bei Pferden mit viel Weiß, das vor allem am Kopf auftritt, oft noch weitere Effekte finden. Da sie von der genetischen Ursache relativ weit entfernt sind und meist in erheblichem Maße durch die Umwelt beeinflusst werden, spricht man hier von unechter Pleiotropie bzw. sekundären Effekten. Da es sich bei Pferden um Leuzisten handelt, ist ihre Pigmentlosigkeit im Haar auf das grundsätzliche Fehlen von Pigmentzellen zurückzuführen, was neben den Haarwurzeln aber auch gleichermaßen die Haut betrifft. Bei diesen Pferden kommen daher größere Flächen unpigmentierter, also weißer Haare immer in Verbindung mit rosafarbener Haut vor. Diese unpigmentierte Haut stellt jedoch nur einen bedingten Schutz gegen die UV-Strahlung der Sonne dar, besonders wenn sie im Maul-Nüstern- oder Augenbereich auch nicht durch längere Haare des Fells geschützt wird. Daher sind Sonnenbrand bzw. eine erhöhte Sonnenempfindlichkeit keine seltene Folge bei großflächig oder völlig weißen Pferden. Ähnliche Probleme treten auch bei stark aufgehellten Fellfarben auf, da diese ebenfalls nur unbedeutende bzw. gar keine Pigmentmengen in der Haut bilden. Schimmel dagegen besitzen eine graue Haut, da nur ihre Haare nicht mehr mit Pigmenten versorgt werden.

Allerdings scheinen sowohl die jeweilige Grundfarbe, die Rassengrundlage als auch das entsprechend mutierte Gen einen Einfluss auf die Stärke des Effekts, also die Empfindlichkeit der Haut, zu besitzen. Leider gibt es auch in diesem Bereich nur wenige wirklich belastbare Untersuchungen, so dass vorrangig nur Beobachtungen von Züchtern und Besitzern zur Verfügung stehen. Diese sind natürlich durch die geringe Tierzahl, Subjektivität der Beobachtung und fehlende Bewertung der Rahmenbedingungen bestenfalls als mögliche Hinweise zu betrachten. So scheinen Weißsabinos beim Berber durchaus recht sonnenempfindlich zu sein, während bei Marwaris in Indien derartige Effekte nicht/kaum zu beobachten sind (Christiane SLAWIK, persönliche Mitteilung). Nach eigenen Beobachtungen suchten weiße Sabino-Overos der Rasse Paint Horse in den Mittagsstunden im Sommer immer den Weideunterstand auf, während ihre gefärbten bzw. überwiegend gefärbten Weidegenossen dies nicht taten. Rosafarbene Hautstellen am Kopf zeigen besonders bei sehr hell gefärbten Pferden häufiger Ekzeme. Hiervon scheinen in starkem Maße helle Fuchsisabellen und reinerbige Fuchsweißisabellen betroffen zu sein.



### 3.7 Founder-(Linien)-Effekt

Beziehungen, die auf der genetischen Nähe von Farb- und Erbfehlermutationen bzw. das Vorhandensein beider Mutationen bei einem Linienbegründer zurückzuführen sind, wurden beim Pferd bisher noch nicht sicher festgestellt. Die Vermutung eines solchen Effekts, wie er bei den silberfarbenen Rocky Mountain Horses beschrieben wurde, scheint zumindest nicht die alleinige Ursache für das Zusammentreffen zu sein (siehe oben). Zwar gibt es für einige Farbmutationen – speziell bei den Weißgeborenen bzw. bei sabinoähnlichen Färbungen – etliche Founder (HAASE et al. 2007, 2009, 2011), aber für diese Populationen wurden bisher entweder keine Erbfehler beschrieben, oder es handelt sich um eine kausale Mutation und damit um klassische Pleiotropie. Ein Beispiel hierfür ist die Dominant-White-Färbung beim Freiburger, die sich auf eine Mutation im *KIT*-Gen zurückführen lässt und wahrscheinlich als Spontanmutation erstmalig bei der 1957 geborenen Stute „Cigale“ auftrat. Da bisher keine reinerbigen Pferde für diese Mutation gefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, dass sie homozygot letal ist (MAU 2003). Mit der Stute „Cigale“ existiert zwar eine Begründerin, der Zusammenhang zwischen weißer Fellfarbe und der möglicherweise intrauterinen Letalität ist aber sehr wahrscheinlich pleiotrop. Diese Annahme wird von Untersuchungen an der Maus unterstützt, bei der Mutationen im *KIT*-Gen, die zur weißen Fellfarbe führen, gleichzeitig negative Auswirkungen auf Blutparameter und Gonaden haben (MANOVA et al. 1990, NOCKA et al. 1990).

Möglicherweise sind solche Founder-Effekte jedoch die Ursache für die immer wieder diskutierten Beziehungen zwischen Fellfarbe und Leistungsparametern. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Untersuchung an Islandpferden. Dabei konnte festgestellt werden, dass Schimmel gegenüber Nichtschimmeln in verschiedenen Leistungsparametern unterlegen waren. Deutlich schlechtere Noten erhielten die Schimmel für die Merkmale Mähne und Schweif, Gesamtnote Exterieur sowie Gehwille und Temperament, während Hufe, Galopp und Reiteigenschaften immerhin tendenziell schlechter waren. Allerdings konnten diese Daten aufgrund eines eingeschränkten Probenumfangs zwar auf Alter und Geschlecht, jedoch nicht auf den Vatoreinfluss korrigiert werden (ISERINGHAUSEN 2011).

Die Schimmelfärbung stellt hier eine insgesamt stärker zu untersuchende Fellfärbung dar. Nach dem Auffinden der mit der Farbe assoziierten Mutation im *STX17*-Gen konnte schnell nachgewiesen werden, dass vor allem homozygote Schimmel verstärkt Melanome und Vitiligo ausbilden (ROSENGREN PIELBERG et al. 2008). Wenngleich die Melanome als gutartig bezeichnet werden, belasten sie bei höherer Anzahl und größerem Umfang das Pferd erheblich, was vor allem beim Auftreten im Analbereich bis zur notwendigen Einschläferung führen kann. Allerdings weisen nicht alle Schimmel diese Erscheinungen auf, wodurch immer wieder die Frage entsteht, ob der Zusammenhang wirklich kausal ist oder ob eine unvollständige Penetranz der Schimmelmutation vorliegt. Hierzu haben CURIK et al. (2013) an zahlreichen Schimmeln Untersuchungen durchgeführt, die auf einen starken Hauptgeneffekt (*STX17*-Gen) hinweisen, aber gleichzeitig modifizierende Einflüsse anderer Gene aufführen. Gerade für Zuchten mit hohem Schimmelanteil (Lipizzaner, Andalusier, Araber u. a.) ergibt sich dadurch vielleicht die Möglichkeit, Schimmel ohne oder nur mit geringfügigen Melanomen zu züchten.

## 4. Schlussfolgerungen im Umgang mit Erbfehlern in der Zucht

Bei klarer klassischer Pleiotropie zwischen Farbe und Erbfehlern ist eine Zucht der gewünschten Fellfarbe ohne Nebeneffekt auf die Gesundheit nicht möglich, da die Mutation beides gleicher-



maßen beeinflusst. Wenn es sich um einen schweren Erbfehler mit dramatischen Folgen für das Pferd handelt, bleibt eigentlich nur der Verzicht auf die Farbzucht. Aber hier streiten sich die Geister. Was ist dramatisch für ein Pferd? Bei klar rezessiv wirkenden Letalfaktoren ist die Entscheidung relativ einfach. Hier sollte konsequent gegen das Allel selektiert werden. Von der Farbe hat man in diesem Fall nichts, da die Pferde nicht lebensfähig sind, wie das beim *Lavender-foal*-Syndrom der Fall ist. Etwas modifiziert gestaltet sich der Umgang mit unvollständig dominanten Merkmalsträgern, bei denen der Erbfehler nur bei den homozygoten Vertretern sichtbar wird (LWF-Syndrom). Hier sollte dem deutschen Tierschutzgesetz entsprechend von den Zuchtverbänden ein klares Verbot der Verpaarung von Heterozygoten umgesetzt werden. Dabei muss den Züchtern vor allem deutlich gemacht werden, dass sie bei einer Verpaarung von einem Anlage-träger mit einem gesunden Pferd genauso 50 % heterozygote Merkmalsträger, in diesem Fall die gewünschten Overoschecken, erhalten, wie bei der Verpaarung von zwei heterozygoten Merkmalsträgern (Overos). Auch hier gibt es immer nur 50 % Merkmalsträger (Overos). Der Unterschied besteht nur darin, dass bei der Verpaarung von zwei Heterozygoten 25 % *Lethal-white*-Fohlen entstehen, im ersten Fall dagegen 50 % gesunde, wenngleich einfarbige Pferde.

Ähnlich sollte mit allen Fellfarben verfahren werden, die homozygot letal sind und heterozygot die gewünschte Farbe zeigen. Beispielsweise werden in der Schweiz keine Hengste mit Dominant-White-Färbung (W1-Mutation), die wahrscheinlich im homozygoten Zustand intrauterin letal ist, in der Zucht eingesetzt (MAU 2003). Damit wird von vornherein eine Verpaarung von zwei heterozygoten Pferden vermieden. Differenzierter sind die Fälle zu betrachten, in denen die Leiden oder Schäden für das Pferd nicht so eindeutig zu bestimmen sind. Dass trifft vor allem für die Augen- und Gehörerkrankungen zu. Hier fehlt es noch an genaueren Untersuchungen zum Befinden des Pferdes, aber auch zu den genetischen Ursachen und möglichen Modifikationen durch weitere Gene. Daher sollten die Züchter kritisch ihre Zuchttiere beobachten und eine verantwortungsbewusste Entscheidung treffen.

Andere Chancen ergeben sich im züchterischen Umgang mit einer echten Kopplung. Hier befinden sich durch Zufall die Mutation für eine Fellfarbe und die Mutation für einen Erbfehler in chromosomaler Nähe und werden nur daher gemeinsam vererbt. Bei einer solchen Konstellation ist es erforderlich, nach möglichen Kopplungsbrüchen – also Tieren, bei denen durch *Crossing over* bereits eine Trennung beider Merkmale erfolgt ist – zu suchen. Dies wären dann die optimalen Zuchttiere für eine Farbzucht ohne Krankheitsfolgen. Allerdings sind diese Zuchttiere mit gewisser Vorsicht zu betrachten, da bei ihnen infolge einer engen Verwandtschaft Inzuchtdepressionen auftreten könnten. Liegt noch kein Kopplungsbruch vor, kann man nur auf ein zufälliges *Crossing over* an dieser Stelle hoffen, um die Farbe mit gesunden Tieren züchten zu können.

Grundsätzlich muss eingeschätzt werden, dass die Zucht auf Fellfarben immer im Gesamtkontext zu sehen ist. Farbe ist ein Element des Exterieurs und muss als solches in den richtigen Rahmen mit den anderen Merkmalen gestellt werden. Die Entscheidung für die Zucht auf eine bestimmte Farbe ist dabei im starken Maße vom Erbgang und der molekulargenetischen Ursache abhängig. Hier liegt Verantwortung sowohl bei den Züchtern selbst als auch bei den Zuchtverbänden, die regulierend eingreifen sollten, wenn die Farbzucht Gefahr läuft, zur Qualzucht zu werden.

Ein wichtiger Schritt ist es dabei, den wissenschaftlichen Vorlauf zu schaffen, um solche Entscheidungen fundiert, gesichert und reproduzierbar zu treffen. Ziel sollte es immer sein, die große, wunderbare Vielfalt der Fellfarben zu erhalten und sie in ihrer Kombination zu erweitern, aber dabei immer ein Auge auf das Wohl des Pferdes, seine Gesundheit, seine Konstitution zu haben.

## Literatur

- ANDERSSON, L. S., AXELSSON, J., DUBIELZIG, R. R., LINDGREN, G., and EKESTEN, B.: Multiple congenital ocular anomalies in Icelandic horses. *BMC Vet. Res.* 7, 21 (2011a)
- ANDERSSON, L. S., JURAS, R., RAMSEY, D. T., EASON-BUTLER, J., EWART, S., COTHRAN, G., and LINDGREN, G.: Equine multiple congenital ocular anomalies maps to a 4.9 megabase interval on horse chromosome 6. *BMC Genet.* 9, 88 (2008)
- ANDERSSON, L. S., LYBERG, K., COTHRAN, G., RAMSEY, D. T., JURAS, R., MIKKO, S., EKESTEN, B., EWART, S., and LINDGREN, G.: Targeted analysis of four breeds narrows equine multiple congenital ocular anomalies locus to 208 kilobases. *Mamm. Genome* 22, 353–360 (2011b)
- BELLONE, R. R.: Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses. *Anim. Genet.* 41, Suppl 2, 100–110 (2010)
- BELLONE, R. R., BROOKS, S. A., SANDMEYER, L., MURPHY, B. A., FORSYTH, G., ARCHER, S., BAILEY, E., and GRAHN, B.: Differential gene expression of TRPM1, the potential cause of congenital stationary night blindness and coat spotting patterns (LP) in the Appaloosa horse (*Equus caballus*). *Genetics* 179, 1861–1870 (2008)
- BROOKS, S. A., and BAILEY, E.: Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in horses. *Mamm. Genome* 16, 893–902 (2005)
- BROOKS, S. A., GABERSKI, N., MILLER, D., BRISBIN, A., BROWN, C., STREETER, C., MEZEY, J., COOK, D., and ANTCZAK D. F.: Whole-genome SNP association in the horse: identification of a deletion in myosin Va responsible for Lavender foal syndrome. *PLoS Genet.* 15, e1000909 (2010)
- BROOKS, S. A., TERRY, R. B., and BAILEY, E.: A PCR-RFLP for KIT associated with tobiano spotting pattern in horses. *Anim. Genet.* 33, 301–303 (2002)
- BRUNBERG, E., ANDERSSON, L., COTHRAN, G., SANDBERG, K., MIKKO, S., and LINDGREN, G.: A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse. *BMC Genet.* 7, 46 (2006)
- COOK, D., BROOKS, S., BELLONE, R., and BAILEY, E.: Missense mutation in exon 2 of SLC36A1 responsible for champagne dilution in horses. *PLoS Genet.* 4, e1000195 (2008)
- CURIK, I., DRUML, T., SELTENHAMMER, M., SUNDSTRÖM, E., PIELBERG, G. R., ANDERSSON, L., and SÖLKNER, J.: Complex inheritance of melanoma and pigmentation of coat and skin in Grey horses. *PLoS Genet.* 9, Epub 2013 Feb. 7 (2013)
- DRING, L. A., HINTZ, H. F., and VAN VLECK, L. D.: Coat color and gestation length in thoroughbred mares. *J. Hered.* 72, 65–66 (1981)
- FAMULA, T. R., OBERBAUER, A. M., and SOUSA, C. A.: Complex segregation analysis of deafness in Dalmatians. *Amer. J. Vet. Res.* 61, 550–553 (2000)
- FORBIS, J.: *Das klassische arabische Pferd*. Berlin, Hamburg: Paul Parey 1980
- GABRESKI, N. A., HAASE, B., ARMSTRONG, C. D., DISTL, O., and BROOKS, S. A.: Investigation of allele frequencies for Lavender foal syndrome in the horse. *Anim. Genet.* 43, 650 (2012)
- GRAHN, B. H., PINARD, C., ARCHER, S., BELLONE, R., FORSYTH, G., and SANDMEYER, L. S.: Congenital ocular anomalies in purebred and crossbred Rocky and Kentucky Mountain horses in Canada. *Can. Vet. J.* 49, 675–681 (2008)
- HAASE, B., BROOKS, S. A., SCHLUMBAUM, A., AZOR, P. J., BAILEY, E., ALAEDDINE, F., MEVISSSEN, M., BURGER, D., PONCET, P. A., RIEDER, S., and LEEB, T.: Allelic heterogeneity at the equine KIT locus in dominant white (W) horses. *PLoS Genet.* 3, e195 (2007)
- HAASE, B., BROOKS, S. A., TOZAKI, T., BURGER, D., PONCET, P. A., RIEDER, S., HASEGAWA, T., PENEDO, C., and LEEB, T.: Seven novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Anim. Genet.* 40, 623–629 (2009)
- HAASE, B., JUDE, R., BROOKS, S. A., and LEEB, T.: An equine chromosome 3 inversion is associated with the tobiano spotting pattern in German horse breeds. *Anim. Genet.* 39, 306–309 (2008)
- HAASE, B., RIEDER, S., TOZAKI, T., HASEGAWA, T., PENEDO, M. C., JUDE, R., and LEEB, T.: Five novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Anim. Genet.* 42, 337–339 (2011)
- HAUSWIRTH, R., HAASE, B., BLATTER, M., BROOKS, S. A., BURGER, D., DROGEMULLER, C., GERBER, V., HENKE, D., JANDA, J., JUDE, R., MAGDESIAN, K. G., MATTHEWS, J. M., PONCET, P. A., SVANSSON, V., TOZAKI, T., WILKINSON-WHITE, L., PENEDO, M. C., RIEDER, S., and LEEB, T.: Mutations in MITF and PAX3 cause “splashed white” and other white spotting phenotypes in horses. *PLoS Genet.* 8, e1002653 (2012)
- HAUSWIRTH, R., JUDE, R., HAASE, B., BELLONE, R. R., ARCHER, S., HOLL, H., BROOKS, S. A., TOZAKI, T., PENEDO, M. C., RIEDER, S., and LEEB, T.: Novel variants in the KIT and PAX3 genes in horses with white-spotted coat colour phenotypes. *Anim. Genet.* May 9, doi: 10.1111/age.12057 [Epub ahead of print] (2013)
- ISERINGHAUSEN, T.: *Beziehungen zwischen Fellfarbe und Leistungseigenschaften beim Isländer und Einbeziehung der Thematik in den berufstheoretischen Unterricht im Ausbildungsberuf Pferdewirt/in*. Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Masterarbeit 2011

- JURASCHKO, K., MEYER-LINDENBERG, A., NOLTE, I., and DISTL, O.: Analysis of systematic effects on congenital sensorineural deafness in German Dalmatian dogs. *Vet. J.* 166, 164–169 (2003a)
- JURASCHKO, K., MEYER-LINDENBERG, A., NOLTE, I., and DISTL, O.: A regressive model analysis of congenital sensorineural deafness in German Dalmatian dogs. *Mamm. Genome* 14, 547–554 (2003b)
- KEELER, C. E.: Coat color, physique, and temperament. *J. Hered.* 38, 271–277 (1947)
- LUDWIG, A., PRUVOST, M., REISSMANN, M., BENECKE, N., BROCKMANN, G. A., CASTANOS, P., CIESLAK, M., LIPPOLD, S., LLORENTE, L., MALASPINAS, A. S., SLATKIN, M., and HOFREITER, M.: Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science* 324, 485 (2009)
- MAGDESIAN, K. G., WILLIAMS, D. C., ALEMAN, M., LECOUTEUR, R. A., and MADIGAN, J. E.: Evaluation of deafness in American Paint Horses by phenotype, brainstem auditory-evoked responses, and endothelin receptor B genotype. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 235, 1204–1211 (2009)
- MANOVA, K., NOCKA, K., BESMER, P., and BACHVAROVA, R. F.: Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 110, 1057–1069 (1990)
- MARIAT, D., TAOURIT, S., and GUÉRIN, G.: A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. *Genet. Sel. Evol.* 35, 119–133 (2003)
- MARKLUND, L., MOLLER, M. J., SANDBERG, K., and ANDERSSON, L.: A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm. Genome* 7, 895–899 (1996)
- MAU, C. C.: Genetische Lokalisierung und molekulare Analyse von „Dominant Weiss (W)“ einer homozygot letalen Mutation beim Pferd. Zürich: Universität Zürich, Veterinärmedizinische Fakultät, Inaugural-Dissertation 2003
- METALLINOS, D. L., BOWLING, A. T., and RINE, J.: A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome: an equine version of Hirschsprung disease. *Mamm. Genome* 9, 426–431 (1998)
- MEYER, H., und MEYER, G.: Pferde anders aufgezüchtet – Steifzüge durch die Natur- und Kunstgeschichte. Hannover: Schlütersche GmbH & Co. KG 2002
- MONTOLIU, L., OETTING, W. S., and BENNETT, D. C.: Color Genes. European Society for Pigment Cell Research. World Wide Web (URL: <http://www.espcr.org/micemut>) 1<sup>st</sup> August 2013
- NOCKA, K., TAN, J. C., CHIU, E., CHU, T. Y., RAY, P., TRAKTMAN, P., and BESMER, P.: Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *EMBO J.* 9, 1805–1813 (1990)
- PRUVOST, M., BELLONE, R., BENECKE, N., SANDOVAL-CASTELLANOS, E., CIESLAK, M., KUZNETSOVA, T., MORALES-MUNIZ, A., O'CONNOR, T., REISSMANN, M., HOFREITER, M., and LUDWIG, A.: Genotypes of predomestic horses match phenotypes painted in Paleolithic works of cave art. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18626–18630 (2011)
- RAK, S. G., and DISTL, O.: Congenital sensorineural deafness in dogs: a molecular genetic approach toward unravelling the responsible genes. *Vet. J.* 169, 188–196 (2005)
- REISSMANN, M., BIERWOLF, J., and BROCKMANN, G. A.: Two SNPs in the SILV gene are associated with silver coat colour in ponies. *Anim. Genet.* 38, 1–6 (2007)
- REISSMANN, M., and LUDWIG, A.: Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals. *Semin. Cell Dev. Biol.* Apr. 9, pii: S1084–9521(13)00050–5, doi: 10.1016/j.semdb.2013.03.014. [Epub ahead of print] (2013)
- RIEDER, S., TAOURIT, S., MARIAT, D., LANGLOIS, B., and GUÉRIN, G.: Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mamm. Genome* 12, 450–455 (2001)
- ROSENGREN PIELBERG, G., GOLOVKO, A., SUNDSTRÖM, E., CURIK, I., LENNARTSSON, J., SELTENHAMMER, M. H., DRUML, T., BINNS, M., FITZSIMMONS, C., LINDGREN, G., SANDBERG, K., BAUMUNG, R., VETTERLEIN, M., STRÖMBERG, S., GRABHERR, M., WADE, C., LINDBLAD-TOH, K., PONTÉN, F., HELDIN, C. H., SÖLKNER, J., and ANDERSSON, L.: A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature Genet.* 40, 1004–1009 (2008)
- SANTSCHI, E. M., PURDY, A. K., VALBERG, S. J., VROTSOS, P. D., KAESE, H., and MICKELSON, J. R.: Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mamm. Genome* 9, 306–309 (1998)
- SANTSCHI, E. M., VROTSOS, P. D., PURDY, A. K., and MICKELSON, J. R.: Incidence of the endothelin receptor B mutation that causes lethal white foal syndrome in white-patterned horses. *Amer. J. Vet. Res.* 62, 97–103 (2001)
- STRAIN, G. M.: Aetiology, prevalence and diagnosis of deafness in dogs and cats. *Br. Vet. J.* 152, 17–36 (1996)
- STRAIN, G. M.: Congenital deafness and its recognition. *Vet. Clin. North. Amer. Small Anim. Pract.* 29, 895–907 (1999)
- WRANGEL, Graf C. G.: Das Buch vom Pferde. II. Band. Sechste vollständig neu bearbeitete und vermehrte Auflage von F. W. K. PLESSING. Stuttgart: Schickhardt & Ebner (Konrad Wittwer) 1928

*Monika Reißmann*

YANG, G. C., CROAKER, D., ZHANG, A. L., MANGLICK, P., CARTMILL, T., and CASS, D.: A dinucleotide mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome (LWFS); a horse variant of Hirschsprung disease. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1047–1052 (1998)

Dr. Monika REISSMANN  
Humboldt-Universität zu Berlin  
Lebenswissenschaftliche Fakultät  
Albrecht-Daniel-Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften  
Molekularbiologisches Zentrum  
Invalidenstraße 42, Raum 2211  
10115 Berlin  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 30 20938431  
Fax: +49 30 20936397  
E-Mail: [monika.reissmann@agr.ar.hu-berlin.de](mailto:monika.reissmann@agr.ar.hu-berlin.de)

## **II. Neue diagnostische Verfahren**



## Vorausschauende Erbfehlerdiagnostik durch Re-Sequenzierung von Schlüsselahnen

Ruedi FRIES (Freising)

### Zusammenfassung

Die relativ kleinen effektiven Populationsgrößen und der massive Einsatz einzelner Bullen können dazu führen, dass sich Defektallele in Rinderpopulationen sehr schnell verbreiten. Homozygotie der Defektallele kann, zeitverzögert nach dem Auftreten der ersten Träger, zu pränataler Letalität und damit zu verminderter Fruchtbarkeit und zu post-nataler Mortalität und Morbidität mit erheblichem Tierleiden und ökonomischen Einbußen führen.

Die Re-Sequenzierung von Schlüsselahnen, d.h. von Tieren, von denen die meisten Allele in der gegenwärtigen Population abstammen, ermöglicht die systematische Erfassung von Defektallelen. Durch den Abgleich mit der *Online Mendelian Inheritance in Animals* (OMIA)-Datenbank und Literaturhinweisen konnte z. B. gezeigt werden, dass ein bis jetzt beim Fleckvieh noch nicht beschriebenes Defektallel segregiert. Dieses führt im homozygoten Zustand zu einer Funktionsstörung der Thrombozyten und zu oft tödlichen Blutungsepisoden. Wichtige Vererber der Fleckviehzucht sind Träger des Defektallels.

Eine weitere Möglichkeit der vorausschauenden Erbfehlerdiagnostik ist die eingehende Analyse von Stoppmutationen, die sich durch eine funktionelle Annotation feststellen lassen. In Zukunft sollten alle Bullen (und deren Eltern), die stark eingesetzt werden, re-sequenziert werden, um so potenziell schädliche Mutationen frühestmöglich, d.h. als *De-novo*-Mutationen zu erfassen.

### Abstract

The small effective population size and the massive use of individual bulls favour the fast propagation of deleterious alleles. Homozygosity of such alleles will often lead to prenatal lethality and concomitant fertility reduction as well as postnatal mortality and morbidity with considerable animal suffering and economic losses. The problems arise in a time lagged manner, *i.e.*, often several generations after the unnoticed occurrence of first carriers.

The re-sequencing of key ancestors, *i.e.*, animals contributing the majority of alleles in the present population, enables the systematic identification of deleterious alleles. Inspecting variants identified by re-sequencing for their occurrence in the Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA) database indicated the segregation of a hitherto in Fleckvieh not observed deleterious allele, causing defective thrombocyte function that often leads to fatal bleeding episodes. It turns out that important Fleckvieh bulls are carriers of the defective allele.

Another approach to the anticipatory diagnosis of genetic disorders is a thorough analysis of stop-mutations identified by functional annotation. It is advisable to re-sequence all heavily used bulls (and their parents) to allow for the earliest possible detection of potentially deleterious alleles as *de novo* mutations.

### 1. Einleitung

Die Erbfehlerproblematik bei Nutztieren ergibt sich vor allem aus dem rezessiven Erbgang der Defekte. Durch den massiven Einsatz einzelner Zuchttiere über die künstliche Besamung kann die Frequenz eines schädlichen Allels in der Population schnell zunehmen, so dass die Wahrscheinlichkeit der Verpaarung von heterozygoten Trägern zeitversetzt nach dem Einsatz der ursprünglichen Träger zum gehäuftem Auftreten von Erbdefekten führt. Oft ist die Frequenz



des schädlichen Allels dann so hoch, dass eine Ausmerzung zu einer empfindlichen Beeinträchtigung von Zuchtprogrammen und damit des Zuchtfortschrittes führt. Das Ziel der Bekämpfung von Erbdefekten muss deshalb die möglichst frühzeitige Identifizierung von schädlichen Allelen sein.

Seit etwa 2008 stehen auch für die Nutztiere dichte, aus „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) bestehende Markersets zur Verfügung. Diese erlauben grundsätzlich genomweite Ansätze zur Erfassung von schädlichen Allelen. In Fall-Kontroll-Studien („genome wide association studies“, GWAS) und anschließender Homozygotiekartierung kann die chromosomale Position der Defektloci schnell eingegrenzt werden (CHARLIER et al. 2008). Dieser Ansatz ermöglicht die rechtzeitige Entdeckung der Erbdefekte durch Erbfehlermonitoring und natürlich auch, dass die Erbdefekte überhaupt erkannt werden. Perinatal auftretende Defekte, die sich als gut sichtbare Missbildungen manifestieren, werden dabei weniger leicht übersehen als Krankheiten, die erst später im Leben eines Tieres auftreten. Beim Rind wurden für die genomische Selektion inzwischen Zehntausende von Tieren genomweit genotypisiert. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, das vollständige oder teilweise Fehlen von Haplotypen im homozygoten Zustand festzustellen („missing homozygotes“) (VANRADEN et al. 2011). Die entsprechenden Chromosomenregionen enthalten Allele, die zu vorgeburtlicher Letalität und/oder zu einer eingeschränkten Überlebensfähigkeit der geborenen Tiere führen. Dieser Ansatz zur Identifizierung von Erbdefekten hat den Vorteil, dass er nicht vom klassischen Erbfehlermonitoring abhängig ist.

Im Folgenden soll am Beispiel der Fleckviehpopulation aufgezeigt werden, wie die Re-Sequenzierung von Schlüsselahnern die effiziente Entdeckung von schädlichen Allelen ermöglicht. Die Re-Sequenzierung bietet auch die Möglichkeit, potenziell schädliche Mutationen zu identifizieren, bevor sie sich phänotypisch oder als „missing homozygotes“ manifestieren.

## 2. Re-Sequenzierung von Schlüsselahnern

Seit der Einführung der *Next-Generation*-Sequenzieretechnologie und dem dramatischen Rückgang der Sequenzierkosten können größere Zahlen von Individuen sequenziert und die resultierenden Sequenzfragmente mit der Referenzsequenz verglichen werden. Die Sequenzierung ganzer Populationen ist immer noch zu teuer. Durch die Sequenzierung von Schlüsselahnern kann jedoch eine enorme Hebelwirkung erzielt werden. Schlüsselahnern sind Tiere, die einen maximalen Anteil der genetischen Variation der aktuellen Population erklären. Sie können über eine Analyse der Verwandtschaftsmatrix identifiziert werden (GODDARD und HAYES 2009). Beim Fleckvieh wurden 57 Tiere re-sequenziert, die mehr als 80 % der Variation erklären, wobei die elf einflussreichsten Tiere alleine 50 % ausmachen (JANSEN et al. 2013; unpublizierte Daten). Es kann davon ausgegangen werden, dass Allele ab einer Frequenz von etwa 5 % bei den sequenzierten Tieren zu finden sind. Das bedeutet, dass in vielen Fällen auch für Erbdefekte verantwortliche Allele unter den bei den re-sequenzierten Ahnentieren festgestellten Varianten zu finden sind. In einer Studie am Lehrstuhl für Tierzucht der Technischen Universität München (TUM) wurden 57 Fleckvieh-, 5 Simmental-, 9 Holstein- und 23 Brown-Swiss-Tiere sequenziert. Dabei wurden mehr als 21 Millionen Varianten festgestellt, mehr als 90 % davon als biallelische SNPs.

Es erfolgte ein Abgleich der Varianten mit Einträgen in *Online Mendelian Inheritance in Animals* (OMIA). Die Untersuchung, ob durch die Re-Sequenzierung festgestellte Varianten

in OMIA (NICHOLAS und HOBBS 2014) als schädliche oder besondere Allele aufgeführt sind, ermöglicht ein erstes Monitoring der re-sequenzierten Tiere auf genetische Defekte und Besonderheiten. Im März 2013 wurden für das Rind 78 Defekte und Besonderheiten aufgeführt, für welche die kausalen Mutationen bekannt sind. Für 59 konnten die Koordinaten in der UMD3.1-Version des Rindergenoms eruiert werden. Unter den re-sequenzierten Tieren befand sich ein bekannter Träger eines Defektallels, das im homozygoten Zustand beim Fleckvieh zu Spinnengliedrigkeit (OMIA 001541-9913, BUITKAMP et al. 2011) führt. Die entsprechende Variante konnte beim re-sequenzierten Trägartier tatsächlich festgestellt werden. Bis jetzt war jedoch nicht bekannt, dass eine Variante des Gens für das Prämelanosomprotein beim Fleckvieh auftritt, die zu einer Aufhellung der Fellfarbe führt (OMIA 001545-9913, SCHMUTZ und DREGER 2013). Der Aufhellungseffekt wird jedoch nur bei Kreuzung mit Trägern des Dominant-Schwarz-Alleles manifest. Von großer Tragweite war der Befund, dass in den re-sequenzierten Tieren auch eine Mutation auftritt, die im homozygoten Zustand zu einer Störung der Blutgerinnung (Thrombopathie) führt (OMIA 001003-9913, BOUDREAU et al. 2007). Es stellte sich heraus, dass sehr stark eingesetzte Bullen Träger des Defektallels sind.

### 3. Annotierung der kodierenden Varianten

Um die Effekte der Varianten abschätzen zu können, müssen Sie annotiert werden, d.h., es muss festgestellt werden, ob sie sich im kodierenden Bereich eines Gens befinden und dort einen Aminosäureaustausch oder einen verfrühten Translationsstopp zur Folge haben. Unsere Annotierung basierte auf der UMD3.1-Version des bovinen Genoms (ZIMIN et al. 2009, FLOREA et al. 2011). Total wurden in 24 Millionen Basen kodierender Sequenz 104 403 Varianten festgestellt. Die totale kodierende Sequenz wird auf etwa 30 Millionen Basen geschätzt. Das bedeutet also, dass ein beträchtlicher Teil der Varianten einer funktionellen Annotierung noch nicht zugänglich ist. Die Annotation beschränkte sich zudem auf die kodierenden Bereiche, d.h., die funktionelle Bedeutung von Varianten außerhalb dieser Bereiche, z. B. in Promotoren und Enhancern, wurde nicht angesprochen. Mehr als die Hälfte (55 %) der Varianten in den kodierenden Bereichen stellen synonyme Mutationen dar, d.h., sie führen nicht zu einem Aminosäureaustausch oder einem verfrühten Stoppcodon. Der Effekt von Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, ist oft schwierig vorherzusagen. Wir verwendeten Polyphen-2 (ADZHUBEI et al. 2010) zur Schätzung solcher Effekte. Fast 70 % der Austausche werden als „gutartig“ vorhergesagt, die restlichen als „möglicherweise schädlich“ oder „wahrscheinlich schädlich“.

#### 3.1 Evaluierung von Stoppmutationen als potenzielle Defektallele

Unter den nicht synonymen Austauschen finden sich zahlreiche Varianten, die zu einem verfrühten Translationsstopp führen. Ein verfrühter Translationsstopp führt in den meisten Fällen zum Verlust der Proteinfunktion und dürfte sich vor allem im homozygoten Zustand massiv auf den Phänotyp der betroffenen Individuen auswirken. Um auszuschließen, dass eine Stoppmutation auf einen Annotationsfehler zurückzuführen ist, muss eine manuelle Nachannotation durchgeführt werden. Etwa 50 % der verfrühten Stoppmutationen stellten sich tatsächlich als Annotationsartefakte heraus. Eine verfrühte Stoppmutation im Gen für das DEAD-Box-Polypeptid 58 (*DDX58*) konnte durch eine manuelle Nachannotation bestätigt werden. Von in-

zwischen 160 re-sequenzierten Schlüsseltieren der Fleckvieh- und Simmentalpopulation sind 154 homozygot für das Wildtypallel und 26 heterozygot. Keines der Tiere ist homozygot für die Stopmutation. Das bedeutet nicht, dass Tiere, die das Schädallel homozygot tragen, überhaupt nicht auftreten. Um die Abwesenheit von Homozygoten bei einer Frequenz von ca. 10 % bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % zu bestätigen, dürfte bei 800 untersuchten Tieren kein homozygotes Individuum auftreten. Das Produkt von *DDX58* spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung viraler und bakterieller RNA und DNA und ist deshalb eine Schlüsselkomponente des angeborenen Immunsystems (MEYLAN et al. 2006, ABDULLAH et al. 2012). Es wird nun zu untersuchen sein, ob die heterozygoten Tiere anfälliger für Infektionen sind. Von besonderem Interesse werden eventuell auftretende homozygote Tiere sein. Es ist zu erwarten, dass solche Tiere in ihrer Entwicklung durch rezidivierende Infekte massiv beeinträchtigt werden und eine erhöhte Abgangsrate aufweisen.

### 3.2 Erkennung von *De-novo*-Mutationen als potenzielle Defekt-Allele

Bei einer Mutationsrate von  $2,5 \cdot 10^{-8}$  sind etwa 175 *De-novo*-Mutationen per diploides Genom und Generation zu erwarten (NACHMAN und CROWELL 2000). Wenn von 1 % kodierender Sequenz ausgegangen wird, betreffen ein bis zwei Mutationen die proteinkodierende Sequenz. Zwei Drittel dieser Mutationen haben einen nicht-synonymen Austausch mit einem möglichen Effekt auf den Phänotyp zur Folge. Jedes Individuum dürfte also im Durchschnitt eine neue Variante mit einem potenziellen Effekt auf den Phänotyp aufweisen. Die ultimative Erbfehlerdiagnostik wird deshalb darin bestehen, stark eingesetzte Zuchttiere und deren Eltern zu re-sequenzieren, um schädliche Allele frühestmöglich zu erfassen und deren Verbreitung in der Population zu unterbinden. Die systematische Re-Sequenzierung wird also auf dem Weg zu weitgehend von Erbdefekten freien Nutztierpopulationen eine entscheidende Rolle spielen.

### Literatur

- ABDULLAH, Z., SCHLEE, M., ROTH, S., MRAHEIL, M. A., BARCHET, W., BÖTTCHER, J., HAIN, T., GEIGER, S., HAYAKAWA, Y., FRITZ, J. H., CIVRIL, F., HOPFNER, K.-P., KURTS, C., RULAND, J., HARTMANN, G., CHAKRABORTY, T., and KNOLLE, P. A.: RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids. *EMBO J.* 31, 4153–4164 (2012)
- ADZHUBEI, I. A., SCHMIDT, S., PESHKIN, L., RAMENSKY, V. E., GERASIMOVA, A., BORK, P., KONDRASHOV, A. S., and SUNYAEV, S. R.: A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 7, 248–249 (2010)
- BOUDREAUX, M. K., SCHMUTZ, S. M., and FRENCH, P. S.: Calcium diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor 1 (CalDAG-GEFI) gene mutations in a thrombopathic Simmental calf. *Vet. Pathol. Online* 44, 932–935 (2007)
- BUITKAMP, J., SEMMER, J., and GÖTZ, K.-U.: Arachnomelia syndrome in Simmental cattle is caused by a homozygous 2-bp deletion in the molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (*MOCS1*). *BMC Genet.* 12, 11 (2011)
- 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)
- FLOREA, L., SOUVOROV, A., KALBFLEISCH, T. S., and SALZBERG, S. L.: Genome assembly has a major impact on gene content: A comparison of annotation in two *Bos taurus* assemblies. *PLoS One* 6, e21400 (2011)
- GODDARD, M. E., and HAYES, B. J.: Genomic selection based on dense genotypes inferred from sparse genotypes. *Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet.* 18, 26–29 (2009)

*Vorausschauende Erbfehlerdiagnostik durch Re-Sequenzierung von Schlüsselalenen*

- JANSEN, S., AIGNER, B., PAUSCH, H., WYSOCKI, M., ECK, S., BENET-PAGES, A., GRAF, E., WIELAND, T., STROM, T. M., MEITINGER, T., and FRIES, R.: Assessment of the genomic variation in a cattle population by re-sequencing of key animals at low to medium coverage. *BMC Genomics* *14*, 446 (2013)
- MEYLAN, E., TSCHOPP, J., and KARIN, M.: Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* *442*, 39–44 (2006)
- NACHMAN, M. W., and CROWELL, S. L.: Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* *156*, 297–304 (2000)
- NICHOLAS, F. W., and HOBBS, M.: Mutation discovery for Mendelian traits in non-laboratory animals: a review of achievements up to 2012. *Anim. Genet.* *45/2*, 157–170 (2014)
- SCHMUTZ, S. M., and DREGER, D. L.: Interaction of MC1R and PMEL alleles on solid coat colors in Highland cattle. *Anim. Genet.* *44/1*, 9–13 (2013)
- VANRADEN, P. M., OLSON, K. M., NULL, D. J., and HUTCHISON, J. L.: Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J. Dairy Sci.* *94*, 6153–6161 (2011)
- ZIMIN, A. V., DELCHER, A. L., FLOREA, L., KELLEY, D. R., SCHATZ, M. C., PUIU, D., HANRAHAN, F., PERTEA, G., VAN TASSELL, C. P., SONSTEGARD, T. S., MARÇAIS, G., ROBERTS, M., SUBRAMANIAN, P., YORKE, J. A., and SALZBERG, S. L.: A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* *10*, R42 (2009)

Prof. Dr. Ruedi FRIES  
Lehrstuhl für Tierzucht  
Technische Universität München  
Liesel-Beckmann-Straße 1  
85354 Freising  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 816 1713228  
E-Mail: ruedi.fries@tum.de

## Was ist Leben?

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

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

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

## Indirekte und direkte Diagnostik monogener bedingter Merkmale in der Tierzucht

Ivica MEDUGORAC (München)

Mit 1 Abbildung

### Zusammenfassung

Erbkrankheiten sind negative genetische Varianten. Daher sorgen alle bisher bekannten Evolutionsmechanismen dafür, dass diese bei einer niedrigen Frequenz, und somit für die Populationsfitness irrelevant, bleiben. Wie kann es trotzdem passieren, dass einzelne negative genetische Varianten eine relativ hohe Frequenz erreichen und ein ernsthaftes Problem für eine Population darstellen? Im Folgenden werden solche außergewöhnlichen demographischen Prozesse aus der Tierzucht beispielhaft an drei Rinderrassen dargestellt und zum Teil mit entsprechenden Prozessen der Humangenetik verglichen. Am Beispiel der rezessiven Erbkrankheiten Spinale Dysmyelinisierung (SDM) und Spinale Muskelatrophie (SMA) sind kombinierte Flaschenhals- und Gründereffekte in der Braunvieh-Brown-Swiss-Population mit aller Deutlichkeit zu beobachten. Eine kombinierte Analyse von pathologischen Befunden, direkter Diagnostik sowie BovineSNP50K- und BovineHD-Genotypen für beide Erbkrankheiten bestätigte, dass nur eine direkte Diagnostik letzte Gewissheit bringt. Es zeigte sich, dass in der gegebenen Situation die Imputation als moderne indirekte Diagnostik nur als eine Vorselektion für einen direkten Gentest dienen kann. Eine umfassende Analyse des *POLLED*-Locus, welche auf BovineHD-Genotypen von über 4800 Rindern aus 17 Rinderrassen basierte, demonstriert, wie neuere Selektionssignaturen die älteren überdecken und eine genaue Imputation selbst bei umfassenden HD-Genotypen verkomplizieren. Die gleichen populationsgenetischen Prozesse, welche für die enorme Ausbreitung von schädlichen genetischen Varianten verantwortlich sind, wirken auch gegen die genetische Vielfalt sowie gegen langfristige und nachhaltige Selektionserfolge. Tierzucht, Veterinärmedizin und Genetik sollten daher neue Zuchtstrategien erarbeiten und in die Praxis implementieren, welche möglichst schonend mit der genetischen Vielfalt umgehen.

### Abstract

Hereditary diseases are negative genetic variants. That is why all yet known evolutionary mechanisms try to keep these variants at low frequencies and consequently meaningless for the overall fitness of a population. But how can it be then, that some negative genetic variants reach relatively high frequencies, thus producing serious problems for a population? In the following, we will describe such extraordinary demographic processes in animal breeding based on three cattle breeds. In parts, these processes will be compared to similar occurrences known from human genetics. The mode of action of combined bottleneck- and founder-effects can obviously be observed by the examples of the recessive hereditary diseases spinal dymyelinization (SDM) and spinal muscular atrophy (SMA) of the Braunvieh-Brown-Swiss population. A combined analysis of pathological findings, direct diagnostics as well as BovineSNP50K and BovineHD genotypes for both hereditary diseases confirmed that only direct diagnostics provide ultimate certainty. It was shown that in the given situation, imputation as a modern indirect diagnostic is only usable as preselection for a subsequent direct gene test. An extensive analysis of the *POLLED* locus based on BovineHD-genotypes of more than 4800 animals from 17 cattle breeds demonstrated that younger selection signatures cover older ones, thus complicating an accurate imputation even when using comprehensive HD-genotypes. The same population genetic processes that are responsible for the vast spreading of harmful genetic variants also act against genetic diversity and sustainable long-term animal breeding. Animal husbandry, veterinary medicine and genetics shall therefore elaborate and implement new breeding strategies which considerably use the existing genetic diversity.

## 1. Außergewöhnliche demographische Prozesse, welche eine Ausbreitung von Erbkrankheiten in Nutztierpopulationen begünstigen

Alle bisher bekannten Evolutionsmechanismen sorgen dafür, dass negative genetische Varianten, welche die Ursache für Erbkrankheiten darstellen, bei einer niedrigen Frequenz verbleiben, und somit auch langfristig keine Bedeutung für die Populationsfitness aufweisen. Daher stellt sich die Frage, wie einzelne negative genetische Varianten dennoch eine relativ hohe Frequenz erreichen und so ein ernsthaftes Problem für eine Population darstellen können. Ursache hierfür können außergewöhnliche demographische Prozesse sein, wie jene aus der Tierzucht, die im Folgenden beispielhaft an drei Rinderrassen dargestellt werden. Da wir in der Tierzucht oft genetische Modelle und Erfahrungen aus der Humangenetik nutzen, werden hier entsprechende Prozesse aus der Humangenetik genannt und zum Teil mit den jeweiligen Vorgängen aus der Tierzucht verglichen.

### 1.1 Genetischer Flaschenhals, Populationsfragmentierung und Drift

In der Humangenetik wurden die wichtigsten Prozesse, die die Ausbreitung von negativen oder auch neutralen genetischen Varianten begünstigen, eindrucksvoll am Beispiel der finnischen und mongolischen Population studiert. Unter *Finnish Disease Heritage* (FDH) versteht man eine Gruppe von 36 seltenen Erbkrankheiten, die in Finnland endemisch oder überproportional repräsentiert sind. Die demographischen Prozesse, die für diese außergewöhnliche Situation in Finnland verantwortlich sind, wurden intensiv erforscht (siehe Review von NORIO 2003a, b, c) und hatten oft einen modellhaften Charakter für andere Populationen und Spezies.

Basierend auf Archäologie, Sprachforschung und Genetik, gelten Abstammung und Populationsgeschichte der heutigen Finnen als besonders gut erforscht. Auch ein 18-faches Populationswachstum innerhalb der letzten 25 Generationen wurde so zuverlässig geschätzt. Dieses Populationswachstum allein bietet aber keine plausible Erklärung für das FDH-Phänomen. Der Besiedlungsprozess von riesigen menschenleeren Landschaften durch vorwiegend Süd-Savo-Familien wurde sehr gut dokumentiert (NORIO 2003a). Dieser Prozess dauerte etwa 200 Jahre (beginnend in den 1550er Jahren) und resultierte in zahlreichen kleinen Siedlungen, die voneinander durch riesige Wälder und Seen isoliert waren. Eine solch fragmentierte Population unterliegt bekannter Weise starker genetischer Drift. Manche genetischen Varianten wurden verloren, andere angereichert. Dies gilt gleichermaßen sowohl für positive oder neutrale, als auch für negative Varianten. Auf diese Weise wurden auch 36 Erbkrankheiten in ihrer Frequenz angehäuft. Die meisten sind exklusiv in Finnland zu finden, die anderen werden nominell häufiger in Finnland als in der gesamten restlichen Welt gefunden. Dies bedeutet aber nicht, dass bei den Finnen mehr Erbkrankheiten zu finden sind als anderswo. Vielmehr handelt es sich bei den in Finnland vorkommenden Erbkrankheiten um „besondere“ Erbkrankheiten, während zahlreiche, in anderen Ländern relativ häufige Erbkrankheiten in Finnland selten bis praktisch abwesend sind. Besonders auffällig sind hier die Phenylketonurie und die Zystische Fibrose. Trotz intensiver Beobachtung treten diese Erkrankungen in Finnland zeh- und mehrfach seltener auf als in anderen Teilen Europas (NORIO 2003a, PASTINEN et al. 2001).

Durch die oben erwähnten Prozesse entstand auch die besondere populationsgenetische Struktur (hohes Kopplungsungleichgewicht [LD]), welche die schnelle molekulargenetische Klärung aller 36 Erbkrankheiten ermöglichte, und so den modellhaften Charakter für andere Populationen bzw. Arten verstärkte. Ähnliche Prozesse sind auch bei Nutztieren zu finden.



Im Folgenden wird ein vergleichbarer populationsgenetischer Prozess aus der Rinderzucht komparativ dargestellt. Außerdem werden die Erbkrankheiten beschrieben, welche aus diesem Prozess resultierten, der sich in der Rinderrasse Original Braunvieh (OBV) und der daraus gezüchteten US-amerikanischen Rasse Brown-Swiss (BS) abspielte. Mitte bis Ende des 19. Jahrhunderts gab es eine effektiv sehr große OBV-Population in der Alpen- und Voralpenregion Europas. In den USA hingegen gab es bis 1869 kein Braunvieh. Von 1869 bis 1936 wurden insgesamt nur 150 Braunviehtiere in die USA exportiert (YODER und LUSH 1937, KUSTERMAN et al. 1996).

Mitte der 1930er Jahre wurden dann wegen der Maul-und-Klauenseuche (MKS)-Krise jegliche Rinderimporte aus Europa in die USA verboten. Die heutige US-amerikanische Brown-Swiss-Population mit etwa 10000 Herdbuchtieren wurde daher lediglich aus den 150 zuvor eingeführten OBV-Tieren gezüchtet. Die in die USA exportierten Braunvieh-Tiere wurden aber nicht alle in einem Gebiet gezüchtet, sondern in mehreren, voneinander isolierten Zuchtgebieten gehalten. In dieser Phase kam es dann, ähnlich der 200-jährigen Besiedelung des Nordostens Finnlands, zu kombinierten Flaschenhals- und Gründereffekten in einer effektiv sehr kleinen und über dieses riesige Land fragmentierten Brown-Swiss-Population. Erst nach dem Einsatz der Kryokonservierung von Sperma (1960er Jahre) kam es zu einer Vernetzung der Brown-Swiss-Population in den USA. Auch in der finnischen Population wurde erst durch die höhere Mobilität in den letzten 100–200 Jahren (5–10 Generationen) eine stärkere Vernetzung möglich. Neben den eindrucksvollen Parallelen zur FDH müssen wir eine weitere populationsgenetische Kraft in der BS-Population berücksichtigen – nämlich die künstliche Selektion. Ein weiterer wesentlicher Unterschied ist, dass die entsprechenden populationsgenetischen Prozesse in Nutztierpopulationen mit einer mehrfach höheren Intensität auftreten als die bekanntesten Beispiele in der Humangenetik. Besonders anschaulich ist folgender nominaler Vergleich: Ein 66-faches Populationswachstum in 20 Braunviehgenerationen steht hier bei vergleichbarer Fragmentierung einem 18-fachen Wachstum innerhalb der letzten 25 Finnengenerationen gegenüber.

In der nach genetischem Flaschenhals stark fragmentierten Brown-Swiss-Population breiteten sich durch genetische Drift spezifische Erbkrankheiten aus. Diese Krankheiten sind: Bovine Progressive Degenerative Myeloenzephalopathie (Weaver), Spinale Muskelatrophie, Spinale Dysmyelinisierung und Spinnengliedrigkeit. Ab den 1960er Jahren wurden intensiv selektierte US-Brown-Swiss-Tiere dann aus den USA nach Europa importiert (AVERDUNK und GOTTSCHALK 1975). Die enorme Expansion der US-Brown-Swiss-Haplotypen in der europäischen Braunviehpopulation hatte einen kombinierten Effekt: Trotz nominell starker Anhäufung der Krankheitsallele kam es erst verzögert zum Auftreten erster Fälle. Deswegen wurden alle vier oben erwähnten Erbkrankheiten der Brown-Swiss-Population erst etwa 20–30 Jahre (4–6 Generationen) nach dem Import von wichtigen Anlageträgern in Europa registriert.

Ähnlich wie vorher für das *Finnish Disease Heritage* kann man zusammenfassend sagen:

- Brown-Swiss ist keine Rasse mit überdurchschnittlichem Vorkommen von Erbkrankheiten, sondern in Brown-Swiss sind „besondere“ Erbkrankheiten zu finden. Diese Erbkrankheiten werden selten in anderen Rassen gefunden. Falls man diese doch in anderen Rassen findet, haben sie einen anderen genetischen Hintergrund. Das ansehnlichste Beispiel hierfür ist die Spinnengliedrigkeit, welche durch verschiedene Mutationen in den sympatrischen Populationen Fleckvieh (BUIKAMP et al. 2011) und Braunvieh (DRÖGEMÜLLER et al. 2010) verursacht wird.

- Diese besonderen Erbkrankheiten wurden durch besondere populationsgenetische Prozesse begünstigt. Diese Prozesse ähneln den Prozessen in der finnischen Humanpopulation, nur traten sie beim Braunvieh mit einer höheren Intensität auf.
- Die besondere populationsgenetische Struktur (hohes LD, kleines  $N_e$  [= effektive Populationsgröße]) erlaubte die relativ schnelle molekulargenetische Klärung dieser Erbkrankheiten. Alle 36 Erbkrankheiten des *Finnish Disease Heritage* wurden bereits auf kausaler Ebene geklärt, und auch aus dem *Brown-Swiss Disease Heritage* wurde nur Weaver bisher nicht molekulargenetisch geklärt, sondern lediglich feinkartiert.

## 1.2 Gründereffekte

Neben genetischen Flaschenhälsen sind Gründereffekte die häufigsten Ursachen für eine unnatürliche Anhäufung von neutralen, positiven oder gar negativen genetischen Varianten.

Auch hier nennen wir zuerst den stärksten bekannten Effekt aus der Humangenetik. Ein Haplotyp bzw. eine Haplotypenlinie einer nicht rekombinierenden Region auf dem Y-Chromosom (paternal vererbte „non-recombining region of the Y“ [NRY]) wurde in 8 % aller Männer aus 16 Subpopulationen vom Pazifik bis zum Kaspischen Meer gefunden (ZERJAL et al. 2003). Hochgerechnet tragen 16 Millionen Männer das NRY aus dem gemeinsamen Urvater. Eine phylogenetische Analyse zeigte, dass der Urvater bzw. Gründer dieser paternalen Haplotypenlinie vor nur etwa 1000 Jahren gelebt hat. Diese Zeitspanne entspricht beim Menschen nur 50 Generationen. Solch eine rapide Verbreitung kann nicht durch Zufall vorkommen, d.h., es müssen systematische Prozesse dahinter stecken, wie z. B. Selektion oder assortative Paarung.

Die geographische Verteilung aller paternalen Haplotypen gegenüber den Haplotypen aus dieser jungen und hochfrequenten Haplotypenlinie ist mit einer mongolischen Herkunft des Gründers bestens erklärbar. Der Gründerhaplotype wird nämlich in den Grenzen des mongolischen Imperiums zur Zeit des Todes von DSCHINGHIS KHAN gefunden. DSCHINGHIS KHAN streute über 200 Söhne in alle Regionen, in die er kam. Aus historischen Daten ist bekannt, dass er die Vaterschaft für seine Söhne anerkannte und sich überall dort, wo es ihm möglich war, um deren soziales Prestige sowie deren Einfluss kümmerte. Die einflussreichen Söhne setzten die Praxis des Vaters fort, und ihre Dynastie überlebte für lange Zeit in den gleichen Grenzen wie zum Zeitpunkt des Todes von DSCHINGHIS KHAN (ZERJAL et al. 2003). Die einzige Ausnahme bilden die Hazaren aus Pakistan. Obwohl sich die Hazaren geographisch außerhalb des mongolischen Einflussbereichs befinden, ist bei ihnen die höchste Frequenz von Haplotypen aus der oben beschriebenen jungen und hochfrequenten Haplotypenlinie zu finden. Die genetischen Daten (QAMAR et al. 2002) sowie mündliche Überlieferungen (MOUSAVI 1998) weisen darauf hin, dass die Hazaren aus Pakistan mongolischer Herkunft sind. Die meisten betrachten sich selbst als direkte paternale Nachkommen von DSCHINGHIS KHAN. Die Genealogie, welche diese Verbindung dokumentiert, wurde aus deren mündlicher Überlieferung (MOUSAVI 1998) rekonstruiert.

Daher ist die plausibelste Erklärung für die historischen, geographischen, demographischen und genetischen Daten, dass dieser NRY-Haplotype tatsächlich von DSCHINGHIS KHAN (1162) stammt und durch ihn und seine Söhne enorm amplifiziert wurde. In der Humangenetik ist das der bis jetzt größte und bekannteste Gründereffekt. Eine hohe Frequenz eines jungen Haplotyps ist ein wichtiges Charakteristikum von Selektionssignaturen. Hier handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine spezielle Form der Selektion, die auf sozialem Prestige baut

und Auswirkungen für die medizinische Genetik in der Region haben kann (ZERJAL et al. 2003).

Bei Nutztieren sind vergleichbare und viel intensivere Gründereffekte leicht zu finden. Im Folgenden wird ein Beispiel aus der Rinderzucht dargestellt. Anfang der 1980er Jahre wollten Fleckviehzüchter Euter- und Milchleistungsmerkmale durch eine Einkreuzung von Rotbunten Bullen verbessern. Dafür wurden 400 Samenportionen des 50%igen RH-Bullen REDAD aus der Schweiz importiert und in gezielten Paarungen eingesetzt. Es wurden einige Söhne mit erwünschten Zuchtwerten gezüchtet und intensiv in der künstlichen Besamung eingesetzt. Auf diese Weise hatte REDAD in Deutschland 229 Söhne und Töchter, 134 110 Enkel und 909 325 Urenkel. Wenn man den bekanntesten Gründereffekt aus der Humangenetik mit den Gründereffekten in der Tierzucht vergleicht, werden dramatische Unterschiede in der Intensität und den möglichen Auswirkungen auf die tiermedizinische Genetik ersichtlich. PAUSCH et al. (2014) bieten ein eindrucksvolles Beispiel für die möglichen Auswirkungen des Gründereffekts auf tiermedizinisch relevante Merkmale in einer Nutztierpopulation. Der reine Fleckviehbulle HAXL (geboren 1966) und dessen Nachkommen wurden in den 1970er und 1980er Jahren sehr stark in der künstlichen Besamung eingesetzt, so dass HAXL als wichtigster Ahne der aktuellen Fleckviehpopulation angesehen wird (JANSEN et al. 2013).

In der Studie von PAUSCH et al. (2014) wurde HAXL als wichtigster Urheber für die rezessiv vererbte männliche Subfertilität identifiziert. Der massive züchterische Einsatz von ihm selbst und seinen Nachkommen resultierte in einer relativ sehr hohen Frequenz (7,2%) für ein Allel mit eindeutig negativem Effekt auf Fitnessmerkmale. Da diese Mutation bzw. dieser Haplotyp keine Assoziation mit Milchproduktionsmerkmalen zeigt, wird keine indirekte positive Selektion vermutet. Dies bedeutet, dass eine genetische Variante mit eindeutig negativem Effekt auf Fitness allein durch übermäßigen züchterischen Einsatz von einem Gründer und dessen Nachkommen auf eine relativ hohe Frequenz gebracht wurde, so dass ein ernsthaftes Problem für die Fleckviehpopulation entstand.

### *1.3 Assortative Paarung*

Die künstliche positive assortative Paarung (d.h. überproportionale Paarung von Individuen, die sich in gewisser Hinsicht besonders ähnlich sind) ist ein wesentlicher Teil der künstlichen Selektion bei Nutz-, Haus- und Heimtieren. Dadurch werden erwünschte Merkmale verbessert oder fixiert. Obwohl die positive assortative Paarung nicht direkt und unvermeidlich zu Inzuchtzuwachs führt, wird eine reduzierte genetische Variabilität und ein Kopplungsungleichgewicht nahe an kausalen Loci der positiv selektierten Merkmale erwartet. Außerdem ist ein stärkerer Effekt bei monogen bedingten Merkmalen zu erwarten.

## **2. Chancen und Beschränkungen der indirekten und direkten Diagnostik anhand konkreter Beispiele aus der Tierzucht**

Die oben genannten populationsgenetischen Prozesse führten in der Kombination nachweislich zu einer ungewöhnlichen Ausbreitung von negativen genetischen Varianten in effektiv kleinen und streng selektierten Nutztierpopulationen. Im Folgenden werden am Beispiel von drei monogenen Merkmalen die Beschränkungen der klassischen und modernen indirekten Diagnostik gezeigt und die Notwendigkeit einer direkten Diagnostik hervorgehoben.

## 2.1 Spinale Dysmyelinisierung (SDM)

Am Beispiel der rezessiven Erbkrankheit Spinale Dysmyelinisierung (SDM, HAFNER et al. 1993) sind kombinierte Flaschenhals- und Gründereffekte in der Brown-Swiss-Braunvieh-Population (BBV) mit aller Deutlichkeit zu beobachten. Mit Abstand wichtigster Gründer des europäischen BBV ist der Bulle ELEGANT (1966). Dieser Bulle und dessen Nachkommen waren in den 1970er Jahren im intensiven Zuchteinsatz. Erst als es in den 1990er Jahren (1992–1997) zum SDM-Krankheitsausbruch kam, wurde ELEGANT als Anlageträger für diese Krankheit erkannt. 2001 wurde SDM kartiert, und seit 2004 gibt es in Deutschland einen indirekten Gentest. Seit 2010 ist die kausale Mutation bekannt (THOMSEN et al. 2010).

Bei einer klassischen indirekten genetischen Diagnostik werden Probanden, deren Vorfahren und Verwandte genotypisiert, haplotypisiert und basierend auf bekannten Phänotypen einer Risikoanalyse unterzogen. Die Ergebnisse dieser Risikoanalyse hängen von mehreren Parametern ab:

- Feinkartierung;
- Frequenz der kausalen Mutation;
- Frequenz der umgebenden Markerallele;
- Haplotypenvielfalt um die kausale Mutation bzw. Frequenz des Haplotyps, in welchem die kausale Mutation untergebracht wurde;
- Alter der kausalen Mutation und
- Dichte von Phänotypen- und Genotypeninformation im Pedigree des Probanden.

Sobald sich irgendeiner dieser Parameter verändert, kann es auch zu veränderten Ergebnissen der Risikoanalyse kommen. Die indirekte Diagnostik von SDM-Probanden war besonders empfindlich, und es kam deutlich häufiger zu unbestimmbaren Fällen als bei andere Erbkrankheiten.

Um die häufigen unbestimmbaren Ergebnisse der indirekten Diagnostik zu klären und eine Möglichkeit für die Imputation von SDM-Genotypen für die zukünftige züchterische Arbeit zu erkunden, wurden SDM-Fälle (Merkmalsträger) sowie SDM-Träger (Anlageträger) mit *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)-Markern (Bovine50K-Chip) analysiert. Der Gründer ELEGANT war für ein Segment von 3,5 Mb proximal der kausalen Mutation komplett homozygot (88 SNPs), jedoch für einen SNP proximal und mehrere distal der kausalen Mutation informativ. Wie erwartet sind alle Merkmalsträger homozygot für die kausale Mutation und besitzen zwei Kopien des SDM-Haplotyps. Alle deklarierten Anlageträger sind heterozygot für die kausale Mutation, und es wurde der gleiche SDM-Haplotyp wie bei ELEGANT gefunden. Allerdings wurde ein Haplotyp, welcher identische SNP-Allele wie der SDM-Haplotyp zeigt, in einer sehr hohen Frequenz in der BBV-Population in einer Reihe von SDM-unverdächtigen Bullenlinien gefunden. Ein Haplotypenfrequenzvergleich von beiden ELEGANT-Haplotypen am SDM-Locus zeigte sogar eine doppelt so hohe Frequenz des SDM-Haplotyps gegenüber dem SDM-freien ELEGANT-Haplotypen in der BBV-Population. Diese Situation spricht für eine relativ rezente Mutation in einem sehr häufigen Haplotypen. Durch den starken Gründereffekt des Bullen ELEGANT wurden zwei Haplotypen, die bis auf die kausale Mutation identisch und/oder nur schwer unterscheidbar sind, in der BBV-Population amplifiziert. Das verhinderte die Entstehung eines populationsweiten LD zwischen SDM-kausaler Mutation und den unmittelbaren SNP-Markern.

In den letzten Jahren wird die Imputation als moderne indirekte genetische Diagnostik beworben. Oft wird diese losgelöst von Pedigree und Phänotypen als Allzweckmittel proklamiert. Sogar rassenübergreifende diagnostische Möglichkeiten werden diskutiert (McCLURE et al. 2013). Das Beispiel SDM zeigt jedoch, dass eine genaue indirekte Diagnostik (Risikoanalyse oder Imputation) massiv behindert wird, wenn eine relativ junge Mutation durch starken Gründereffekt verbreitet wird. In dieser Situation dienen auch dichte und relativ eng gekoppelte SNP-Haplotypen nur als eine schwache Vorselektion für einen direkten Gentest. Es stellt sich die berechnete Frage, ob eine höhere Markerdichte (z. B. BovineHD-Chip) zu besseren Imputationsergebnissen führen wird. Diese Frage wird hier nur indirekt, basierend auf vergleichbaren Analysen der Spinalen Muskelatrophie (SMA) in der BBV-Population, beantwortet.

## *2.2 Spinale Muskelatrophie (SMA)*

Im Gegenteil zur Spinalen Dysmyelinisierung (SDM) war die indirekte genetische Diagnostik für die bovine Spinale Muskelatrophie (SMA) (KREBS et al. 2006) sehr präzise und erfolgreich. Hier wurden die wichtigsten SMA-Anlageträger, einige Merkmalsträger und eine Referenzpopulation von 660 Bullen mit dem BovineSNP50K-Chip genotypisiert. Die Frequenz des SMA-Haplotyps in dieser verzerrten Stichprobe (Schwerpunkt auf Trägerlinien gesetzt) wurde auf 4,5 % geschätzt. Außerdem wurden auch zwei Original Braunvieh (Sohn und Mutter) als Träger des SMA-Haplotyps erkannt. Die Anwesenheit von SMA im Schweizer Original Braunvieh (OBV) wurde durch einen direkten Gentest bestätigt. Ob es sich hier um eine nicht deklorierte Kreuzung mit Brown-Swiss oder um eine vorher unbekannte Segregation von SMA in OBV handelt, bleibt vorerst unklar.

In einer Zusammenarbeit mit Dr. SEEFRIED (Qualitas AG, Schweiz) wurde ein kombinierter Datensatz für ein Imputations-Prozedere zusammengestellt. Dieser Datensatz kombiniert pathologische Befunde (N = 110), direkte Diagnostik (1190), BovineSNP50K (6000) und BovineHD-Genotypen (1000 Bullen und 10 SMA-Fälle). Die Imputation bestätigte bekannte nicht für die kausale Mutation genotypisierte Anlageträger. Zudem wurden einige plausible, jedoch bisher unbekannte Anlageträger für den direkten Test vorselektiert.

Ein Vergleich der verfügbaren Informationen spricht für eine deutlich bessere Ausgangssituation bei SMA im Vergleich zur SDM:

- Die SMA-Mutation sollte deutlich älter sein als die SDM-Mutation (Vielfalt an Trägerlinien und Vorhandensein in OBV),
- ein deutlich besserer klassischer indirekter Gentest bei SMA und
- eine deutlich höhere Dichte an phänotypischen und genotypischen Informationen beim SMA-Imputationdesign.

Dennoch wurden auch hier einige eindeutig falsch-positive Ergebnisse durch die Imputation erzielt. Einzelne Zuchtbullen wurden sporadisch als SMA-homozygot imputiert. Da SMA-Homozygote bereits mit 3–4 Wochen erste Krankheitssymptome zeigen und bald danach sterben (EL-HAMIDI et al. 1989), sind diese Ergebnisse eindeutig falsch. Dennoch wurden sogar einzelne OBV-Bullen als SMA-homozygot imputiert. Sämtliche weiteren OBV-Tiere, die als SMA-Anlageträger imputiert wurden, wurden mit einem direkten Gentest überprüft und als falsch-positiv identifiziert. Dieses Beispiel zeigt, dass auch bei einer relativ höheren Informationsdichte die Imputation nur als Vorselektion für einen direkten Gentest dienen sollte und dass nur der direkte Test letzte Gewissheit bringt.

### 2.3 Hornlosigkeit (*POLLED*)

Ein weiteres interessantes Beispiel für die Beschränkung der Imputation als indirekte Diagnostik bietet der Hornlosigkeitslocus. In einer Zusammenarbeit mit Dr. CAPITAN (INRA) wurden HD-Genotypen von hornlosen und gehörnten Rindern untersucht (ALLAIS-BONNET et al. 2013). Alle untersuchten hornlosen Rinder teilten ein Segment von 79 benachbarten SNP-Markern (1,69 – 2,02 Mb; *POLLED*-Haplotyp). Um Haplotypenfrequenzen in westeuropäischen Rindern zu schätzen, wurden HD-Haplotypen von 4843 Bullen aus 17 gehörnten Rinderrassen analysiert. Es wurde eine extrem hohe Frequenz (44–88 %) des *POLLED*-Haplotyps in allen gehörnten Rassen beobachtet und ein enormer Verlust an genetischer Diversität um den *POLLED*-Locus festgestellt. Der *POLLED*-Haplotyp war der einzige Haplotyp in den hornlosen und der häufigste Haplotyp in allen gehörnten Rassen. Der größte Diversitätsverlust ist um den *POLLED*-Locus selbst zu beobachten. Dies deutet auf eine sehr alte, von der Hornlosigkeit unabhängige Selektionssignatur hin. Bei einer solchen Haplotypenverteilung ist eine seriöse Imputation nur im Sinne der klassischen indirekten Diagnostik möglich, d.h. unter Berücksichtigung von Rekombinationen, Frequenzen, Verwandtschaften und bekannten Phänotypen.

### 3. Kartierung der Inzuchtdepression und assortative Paarung

Obige Beispiele zeigen, dass alte und neue Selektionssignaturen sowie außergewöhnliche populationsgenetische Prozesse zu spezifischen Haplotypenstrukturen führen, welche die direkte und indirekte Diagnostik beeinflussen. Diese Prozesse führen nicht nur zur Anhäufung von sichtbaren genetischen Krankheiten (Erkrankung geborener Individuen), sondern auch, oder viel mehr, zur Anhäufung von „versteckten“ genetischen Defekten. Diese „versteckten“ genetischen Defekte verhindern das Entstehen einer Zygote oder führen zu frühem embryonalen oder fötalen Tod. Der abgestorbene Embryo oder Fötus wird vom Uterus resorbiert, ohne dass der Züchter etwas merkt. Durch eine erneute Besamung mit dem gleichen oder einem anderen Paarungspartner kommt es in der Regel zur normalen Fötusentwicklung und zur Geburt. Deswegen spiegeln sich solche letalen genetischen Defekte in verminderter maternaler und/oder paternaler Fruchtbarkeit oder Fitness wider. Hohe Selektionsintensität, massiver züchterischer Einsatz von Spitzenvererbern und positive assortative Paarung in Kombination mit der allgegenwärtigen Präsenz schädlicher Mutationen führt fast unausweichlich zu einer negativen Korrelation zwischen den so erzielten hohen Leistungen und der Fruchtbarkeit.

Die klassische Kartierung von Erbkrankheiten wird im sogenannten Fall-Kontrolle-Design durchgeführt. Wie aber könnte man Mutationen, die zu keinen Fällen führen, genetisch kartieren und durch direkte oder indirekte Diagnostik bekämpfen?

Ein paradoxes Beispiel bietet das Wackelhorn-Syndrom 2 (*Scurs2*) in der Charolais-Population. Reinrassige Charolais waren 100 % gehörnt. Hornlosigkeit und Wackelhorn-Mutationen wurden absichtlich aus anderen Rassen eingeführt und positiv selektiert. Um eine genauere Selektion zu ermöglichen, wurde eine Kartierung von *Scurs2* durchgeführt und die kausale Mutation entdeckt. Erst dadurch wurde *Scurs2*, welches vorher positiv selektiert wurde, als letaler Defekt erkannt (CAPITAN et al. 2011). Die pränatale Mortalität im homozygoten Zustand wurde nur indirekt durch die komplette Abwesenheit von Homozygoten bestä-



tigt. Dieses Beispiel zeigt, dass eine fehlende Homozygotie einen guten Indikator für die Präsenz von „versteckten“ genetischen Defekten in der Population darstellt.

Eine Suche nach häufigen Haplotypen, die nicht im homozygoten Status auftreten, wurde zuerst von VANRADEN et al. (2011) vorgeschlagen. Später wurde dieser Ansatz unter Nutzung von Ganzgenomsequenzen ausgebaut und zur Bestätigung von drei vorher vorgeschlagenen kausalen Mutationen sowie zur Entdeckung dreier neuer Mutationen, die pränatalen Tod in drei Rinderrassen verursachen, verwendet (FRITZ et al. 2013).

Wie bereits oben erwähnt, führt die positive assortative Paarung zu Kopplungs- und/oder Hardy-Weinberg-Ungleichgewicht (HWU) in genomischen Regionen nahe den kausalen Mutationen für erwünschte Merkmale. Dies kann mit einem Beispiel aus der Holsteinzucht verdeutlicht werden. Unter der Dachorganisation des Deutschen Holstein Verbandes (DHV) werden Rot- und Schwarzbunte Rinder mit gemeinsamem Zuchtprogramm und gemeinsamer Zuchtwertschätzung gezüchtet. Dennoch werden vorwiegend schwarze mit schwarzen und rote mit roten assortativ angepaart. In einer solchen Situation erwarten wir ein Ungleichgewicht in der Verteilung von Genotypen oder Haplotypen nahe am Melanocortin 1-Rezeptor (MC1R)-Gen, welches für die Rotfärbung verantwortlich ist (KLUNGLAND et al. 1995). Um ein Ungleichgewicht zu kartieren, wurden in einem Design von 2527 Holsteinrindern (158 Rotbunten) genomweite Haplotypen rekonstruiert. Das Genom wurde in überlappende Blöcke aus sechs benachbarten SNPs unterteilt und die Haplotypenfrequenzen sowie Kontingenztabelle für alle beobachteten und erwarteten Diploypen geschätzt. Die Kartierung der HWU-Signale wurde mit einer Chi<sup>2</sup>-Teststatistik für gleitende SNP-Fenster entlang dem Genom durchgeführt. Aus den genomweiten Ergebnissen für Holsteinrinder sind deutliche HWU-Signale auf einzelnen Chromosomen zu beobachten, besonders auf Rinderchromosom 3 und 18. Das für die Rotfärbung verantwortliche Gen MC1R ist auf Rinderchromosom 18 (14757332-14759082 bp; UMD3.1) zu finden. Genau in dieser Region ist das zweitstärkste HWU-Signal zu finden (Abb. 1). Diese vorläufigen Ergebnisse dienen nur als ein Hinweis und als Diskussionsgrundlage dafür, dass durch Ungleichgewichtskartierung neben fehlenden Haplotypenkombinationen („versteckten“ genetischen Defekten) auch Signale assortativer Paarung entdeckt werden können.

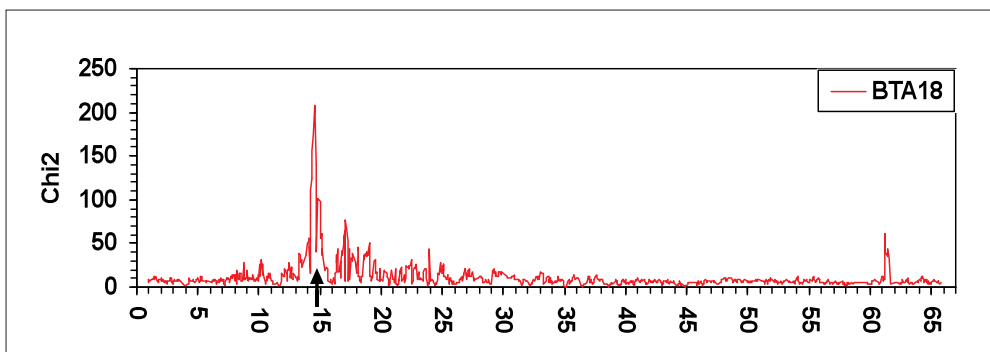


Abb. 1 Ergebnisse der Hardy-Weinberg-Ungleichgewicht-Kartierung auf Rinderchromosom 18. Die X-Achse stellt die physikalische Position in Megabasen dar. Auf der Y-Achse sind die Chi-Quadrat-Teststatistik-Werte für alle Positionen entlang dem Rinderchromosom 18 dargestellt. Die Position des für die Rotfärbung verantwortlichen Gens MC1R ist mit einem Pfeil markiert.



Das Detektieren von weiteren kausalen Mutationen mit Effekt auf pränatale Mortalität wird einen realistischen Blick auf „versteckte“ Konsequenzen des stetig steigenden Inzuchtgrads in stark selektierten und effektiv kleinen Teilpopulationen ermöglichen. Mit jeder weiteren entdeckten Mutation mit Effekt auf die pränatale Mortalität wird ein realistischer Blick auf Konsequenzen des übermäßigen züchterischen Einsatzes einzelner Spitzenvererber deutlich. Dies sollte sich positiv auf das Umdenken und die Entwicklung neuer Zuchtstrategien und gezielter genomisch-gesteuerter Paarungsprogramme auswirken.

#### **4. Schlussfolgerungen und Ausblick**

Sowohl Tierzüchter als auch Tierzuchtgesetz sollten sich mit der Gewissheit anfreunden, dass höchstwahrscheinlich jedes Individuum Träger von mehreren schädlichen rezessiven Allelen ist. Einzelne solcher schädlichen rezessiven Varianten könnten sich durch außergewöhnliche demographische Prozesse zu einer ungewöhnlich hohen Frequenz in den Populationen anhäufen. Diese in den natürlichen Populationen eigentlich außergewöhnlichen demographischen Prozesse sind in Nutztierpopulationen eher die Regel. Dieser Umstand hat gleich mehrfache praktische Konsequenzen. Eine gesetzliche Verpflichtung, alle Anlageträger für eine Erbkrankheit aus der Zucht auszuschließen, wird praktisch nicht durchführbar sein. Die Anwendung von bestimmten Zuchtstrategien selbst ist für die Ausbreitung von negativen genetischen Varianten verantwortlich. Dieselben Strategien führen zu einer relativ schnellen Ausbreitung junger schädlicher Varianten. Besonders diese verlangen nach direkter genetischer Diagnostik. Die gleichen populationsgenetischen Prozesse, welche für eine enorme Ausbreitung von schädlichen genetischen Varianten verantwortlich sind, wirken auch gegen die genetische Vielfalt. Eine intensive künstliche Selektion bevorzugt positive genetische Varianten mit großem Effekt. Einige wertvolle positive genetische Varianten mit relativ kleinem Effekt gehen so durch genetische Drift verloren, was ebenfalls gegen langfristige und nachhaltige Selektionserfolge wirkt (MEĐUGORAC et al. 2011).

Tierzucht, Veterinärmedizin und Genetik tragen die Verantwortung, schädliche Prozesse rechtzeitig zu erkennen und frühzeitig geeignete Gegenmaßnahmen einzuleiten. Deswegen sollten neue Zuchtstrategien erarbeitet werden, welche die genetische Vielfalt in effektiv großen Populationen möglichst schonend nutzen.

Literatur

- ALLAIS-BONNET, A., GROHS, C., MEDUGORAC, I., KREBS, S., DJARI, A., GRAF, A., FRITZ, S., SEICHTER, D., BAUR, A., RUSS, I., BOUET, S., ROTHAMMER, S., WAHLBERG, P., ESQUERRÉ, D., HOZE, C., BOUSSAHA, M., WEISS, B., THÉPOT, D., FOUILLOUX, M. N., ROSSIGNOL, M. N., VAN MARLE-KÖSTER, E., HREIDARSÐÓTTIR, G. E., BARBEY, S., DOZIAS, D., COBO, E., REVERSE, P., CATROS, O., MARCHAND, J. L., SOULAS, P., ROY, P., MARQUANT-LEGUIENNE, B., LE BOURHIS, D., CLÉMENT, L., SALAS-CORTES, L., VENOT, E., PANNETIER, M., PHOCAS, F., KLOPP, C., ROCHA, D., FOUCHET, M., JOURNAUX, L., BERNARD-CAPEL, C., PONSART, C., EGGEN, A., BLUM, H., GALLARD, Y., BOICHARD, D., PAILHOX, E., and CAPITAN, A.: Novel insights into the bovine polled phenotype and horn ontogenesis in *Bovidae*. *PLoS One* 8, e63512 (2013)
- AVERDUNK, G., und GOTTSCHALK, A.: Möglichkeiten der Kreuzungszucht beim Zweinutzungsrind: Brown-Swiss × Braunvieh in Bayern – eine Zwischenbilanz. *Züchtungskunde* 47, 393–403 (1975)
- BUITKAMP, J., SEMMER, J., and GÖTZ, K. U.: Arachnomelia syndrome in Simmental cattle is caused by a homozygous 2-bp deletion in the molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (MOCS1). *BMC Genet.* 12, 11 (2011)
- CAPITAN, A., GROHS, C., WEISS, B., ROSSIGNOL, M.-N., REVERSE, P., and EGGEN, A.: A newly described bovine type 2 scurs syndrome segregates with a frame-shift mutation in TWIST1. *PLoS One* 6, e22242 (2011)
- 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)
- EL-HAMIDI, M., LEIPOLD, H. W., VESTWEBER, J. G., and SAPERSTEIN, G.: Spinal muscular atrophy in Brown Swiss calves. *Zentralbl. Veterinarmed. A* 36, 731–738 (1989)
- HAFNER, A., DAHME, E., OBERMAIER, G., SCHMIDT, P., and DIRKSEN, G.: Spinal dysmyelination in new-born Brown Swiss × Braunvieh calves. *Zentralbl. Veterinarmed.* [B] 40, 413–422 (1993)
- FRITZ, S., CAPITAN, A., DJARI, A., RODRIGUEZ, S. C., BARBAT, A., GROHS, C., WEISS, B., BOUSSAHA, M., ESQUERRÉ, D., KLOPP, C., ROCHA, D., and BOICHARD, D.: Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in GART, SHBG and SLC37A2. *PLoS One* 8, e65550 (2013)
- JANSEN, S., AIGNER, B., PAUSCH, H., WYSOCKI, M., ECK, S., BENET-PAGES, A., GRAF, E., WIELAND, T., STROM, T. M., MEITINGER, T., and FRIES, R.: Assessment of the genomic variation in a cattle population by re-sequencing of key animals at low to medium coverage. *BMC Genomics* 14, 446 (2013)
- KLUNGLAND, H., VÅGE, D. I., GOMEZ-RAYA, L., ADALSTEINSSON, S., and LIEN, S.: The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome* 6, 636–639 (1995)
- KREBS, S., MEDUGORAC, I., RUSS, I., OSSENT, P., BLEUL, U., SCHMAHL, W., and FÖRSTER, M.: Fine-mapping and candidate gene analysis of bovine spinal muscular atrophy. *Mamm. Genome* 17, 67–76 (2006)
- KUSTERMANN, W., MEDUGORAC, I., und PIRCHNER, F.: Bewertung tiergenetischer Ressourcen am Beispiel des Original Braunviehs. 2. Mitteilung: Genetische Distanzen zwischen Original Braunvieh und Brown Swiss sowie anderen Rinderpopulationen. *Züchtungskunde* 68, 109–130 (1996)
- MCCLURE, M., KIM, E., BICKHART, D., NULL, D., COOPER, T., COLE, J., WIGGANS, G., AJMONE-MARSAN, P., COLLI, L., SANTUS, E., LIU, G. E., SCHROEDER, S., MATUKUMALLI, L., VAN TASSELL, C., and SONSTEGARD, T.: Fine mapping for Weaver syndrome in Brown Swiss cattle and the identification of 41 concordant mutations across NRCAM, PNPLA8 and CTTNBP2. *PLoS One* 8, e59251 (2013)
- MEDUGORAC, I., VEIT-KENSCH, C. E., RAMLJAK, J., BRKA, M., MARKOVIC, B., STOJANOVIC, S., BYTYQI, H., KOCHOSKI, L., KUME, K., GRÜNENFELDER, H. P., BENNEWITZ, J., and FÖRSTER, M.: Conservation priorities of genetic diversity in domesticated metapopulations: a study in taurine cattle breeds. *Ecology and Evolution* 1, 408–420 (2011)
- MOUSAVI, S. A.: *The Hazaras of Afghanistan*. 1<sup>st</sup>. Ed. Richmond: Curzon Press 1998
- NORIO, R.: Finnish Disease Heritage I: Characteristics, causes, background. *Hum. Genet.* 112, 441–456 (2003a)
- NORIO, R.: Finnish Disease Heritage II: Population prehistory and genetic roots of Finns. *Hum. Genet.* 112, 457–469 (2003b)
- NORIO, R.: Finnish Disease Heritage III: The individual diseases. *Hum. Genet.* 112, 470–526 (2003c)
- PASTINEN, T., PEROLA, M., IGNATIUS, J., SABATTI, C., TAINOLA, P., LEVANDER, M., SYVÄNEN, A. C., and PELTONEN, L.: Dissecting a population genome for targeted screening of disease mutations. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2961–2972 (2001)
- PAUSCH, H., KÖLLE, S., WURMSER, C., SCHWARZENBACHER, H., EMMERLING, R., JANSEN, S., TROTTMANN, M., FUERST, C., GÖTZ, K. U., and FRIES, R.: A nonsense mutation in TMEM95 encoding a nondescript transmembrane protein causes idiopathic male subfertility in cattle. *PLoS Genet.* 10, e1004044 (2014)
- QAMAR, R., AYUB, Q., MOHYUDDIN, A., HELGASON, A., MAZHAR, K., MANSOOR, A., ZERJAL, T., TYLER-SMITH, C., and MEHDI, S. Q.: Y-chromosomal DNA variation in Pakistan. *Amer. J. Hum. Genet.* 70, 1107–1124 (2002)
- YODER, D. M., and LUSH, J. L.: A genetic history of the Brown Swiss cattle in the United States. *J. Heredity* 28, 154–160 (1937)

*Ivica Medjugorac*

- 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, 175–183 (2010)
- VANRADEN, P. M., OLSON, K. M., NULL, D. J., and HUTCHISON, J. L.: Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J. Dairy Sci.* 94, 6153–6161 (2011)
- ZERJAL, T., XUE, Y., BERTORELLE, G., WELLS, R. S., BAO, W., ZHU, S., QAMAR, R., AYUB, Q., MOHYUDDIN, A., FU, S., LI, P., YULDASHEVA, N., RUZIBAKIEV, R., XU, J., SHU, Q., DU, R., YANG, H., HURLES, M. E., ROBINSON, E., GEREL-  
SAIKHAN, T., DASHNYAM, B., MEHDI, S. Q., and TYLER-SMITH, C.: The genetic legacy of the Mongols. *Amer. J. Hum. Genet.* 72, 717–721 (2003)

PD Dr. Ivica MEDUGORAC  
Institut für Tierzucht  
Lehrstuhl für Tierzucht und  
Allgemeine Landwirtschaftslehre  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Veterinärstraße 13  
80539 München  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 89 21803310  
Fax: +49 89 2180993310  
E-Mail: [Ivica.Medjugorac@gen.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:Ivica.Medjugorac@gen.vetmed.uni-muenchen.de)

### **III. Tierschützerische und zuchtstrategische Entscheidungen**



## Zur Erbfehlerdiagnostik-Situation in russischen Nutztierassen

Natalia ZINOVIEVA, Elena GLADYR, Olga KOSTJUNINA (Moskau, Russland)  
und Gottfried BREM ML, wM ÖAW (Wien, Österreich)

Mit 4 Abbildungen und 2 Tabellen

### Zusammenfassung

Von den in der NCBI (*National Center for Biotechnology*)- und OMIA (*Online Mendelian Inheritance in Animals*)-Datenbank molekulargenetisch beschriebenen Erbdefekten wurden 79 beim Rind, 18 beim Schwein und 17 beim Schaf analysiert. Dabei wurden die für die Selektion wichtigen genetischen Anomalien, die zur Durchführung des genetischen Monitorings in den Populationen der landwirtschaftlichen Zuchttiere erforderlich sind, ausgewählt. Die Forschungsarbeiten der Jahre 2005 bis 2012 konzentrierten sich auf die mutanten Allele folgender Gene: SLC35A3, ITGB2, UMPS, FXI und SLC39A4. Diese sind für schwere Erbkrankheiten wie komplexe vertebrale Missbildungen, BLAD-Syndrom, Blutgerinnungsfaktor XI-Mangel und Zinkmangel beim Rind verantwortlich. Bei Schweinen wurden die Gene für RYR1 (Maligne Hyperthermie, PSE-Syndrome), PRKAG3 (Protein Kinase, AMP-Activated, Gamma 3 Non-Catalytic Subunit) und SPEF2 (Sperm Flagellar 2), die „Säure-Fleisch“-RN (Rendement Napole)-Gene und das ISTS-Syndrom (*Short-Tail Sperm Defect*) analysiert. Beim Schaf wurden Polymorphismen des PRNP (Prionprotein)-Gens, dessen mutantes Allel mit Spongiformer Enzephalopathie in Verbindung gebracht wird, untersucht. Zur Durchführung der Analysen wurden eigene molekulargenetische Testsysteme mittels PCR, RFLP und Pyrosequenzierung verwendet. Es wurden die Häufigkeiten für Anlageträger der oben genannten Mutationen errechnet. Diese betragen bei den untersuchten Holstein-Friesian- und Schwarzbunten Rinderrassen sowie bei den Schwein- und Schafrassen aus landwirtschaftlichen Zuchtbetrieben in Russland für SLC35A 2,1 %, ITGB2 1,8 %, FXI 0 %, SLC39A4 0 %, RYR1 2,1 %, PRKAG3 0 %, SPEF2 1,2 % und PRNP (VRQ) 3 %. Träger des mutanten RYR1-Allels wurden in allen für die industrielle Fleischproduktion wichtigen Schweinerassen gefunden. Die Auftretshäufigkeiten dieser Mutation betragen 2 % für Große Weiße und Yorkshire (n = 1920), 1,5 % für Landrasse (n = 1606), 3 %, für Duroc (n = 437) und 10,0 % für Pietrain (n = 50). Die Träger des VRQ-Haplotypes wurden in 8 von 13 Schafrassen in Russland (n = 1336) nachgewiesen. Die Auftretshäufigkeit schwankte von 0 % bis 10,8 % und betrug 3,4 % für die Rasse Romanovskaya und 11 % für Schneeböcke. Anhand der Gene SLC35A3 und ITGB2 wurde die Effektivität des Einsatzes der DNA-Diagnostik zur Kontrolle und Reduktion der Verbreitung genetischer Defekte in den Zuchtierpopulationen Russlands aufgezeigt.

### Abstract

Of the hereditary defects described in the NCBI (*National Center for Biotechnology*) and OMIA (*Online Mendelian Inheritance in Animals*) database 79 molecular genetic defects described in cattle, 18 in pigs and 17 sheep were analysed. For selection against genetic anomalies, that are required to perform the genetic monitoring in populations of farm animals were breeding, distinct defects were selected. Research within the years 2005–2012 focused on the mutant alleles of the following genes: SLC35A3, ITGB2, UMPS, FXI and SLC39A4. They are responsible for severe genetic diseases such as complex vertebral malformations, BLAD syndrome, coagulation factor XI deficiency and zinc deficiency in cattle. In pigs, the genes for RYR1 (malignant hyperthermia, PSE syndrome), PRKAG3 (protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit) and SPEF2 (Sperm Flagellar 2), the “acid meat” RN (yield Napole) genes and ISTS syndrome (short tail sperm defect) were analysed. In sheep polymorphisms of the PRNP (prion protein) gene, the mutant allele is associated with spongiform encephalopathy, were investigated. For carrying out the analyses own molecular genetic test systems by means of PCR, RFLP, and pyrosequencing were used. The frequencies for carriers of the above mutations were calculated. In the investigated Holstein Friesian cattle breeds as well as in the pig and sheep breeds from agricultural farms in Russia the frequencies calculate were: SLC35A 2.1 %, ITGB2 1.8 %,

FXI 0%, SLC39A4 0%, RYR1 2.1%, PRKAG3 0%, SPEF2 1.2% and PRNP (VRQ) 3%. Carriers of the mutant RYR1 allele were found in all pig breeds important for the industrial production of meat. The occurrence frequencies of this mutation were as follows: 2% Large White and Yorkshire (n = 1920), 1.5% Landrace (n = 1606), 3% Duroc (n = 437) and 10.00% Pietrain (n = 50). Carriers of the VRQ haplotype were detected in 8 of 13 sheep breeds in Russia (n = 1336). The frequency of occurrence ranged from 0% to 10.8% and was 3.4% for the breed Romanovskaya and 11% for snow bucks. Based on the genes SLC35A3 and ITGB2 the effectiveness of the use of DNA diagnostics has been shown for controlling and reducing the spread of genetic defects in the breeding populations of Russia.

Die Forschungen zur Biotechnologie der landwirtschaftlichen Tiere, die in den Instituten der Russischen Akademie der Landwirtschaft durchgeführt werden, sind unter den wichtigen Technologien für die Entwicklung der Wissenschaft und der Technik der Russischen Föderation aufgelistet. Dort wurden folgende zentralen Bereiche hervorgehoben:

- Nano-, Bio-, Info- und kognitive Technologien;
- biomedizinische und veterinärmedizinische Technologien;
- Genom- und Proteom-Technologien;
- Zelltechnologien und die Technologien der Biotechnik.

Im Programm zur Entwicklung der Biotechnologie in Russland bis zum Jahr 2020 sind im Bereich „Landwirtschaftliche Biotechnologie“ folgende Methoden von höchster Priorität:

- Schaffung neuer landwirtschaftlicher Tierrassen mittels moderner post-genomischer und biotechnologischer Methoden;
- Entwicklung und Einführung von Gen-Pass-Methoden für die Effektivitätssteigerung der selektiven Zuchtarbeit,
- Klonierungstechnologien bei Zuchttieren.

Als Grundlage für die Durchführung dieser Forschungen dient die Erstellung von DNA-Datenbanken landwirtschaftlicher Nutztier- und Geflügelrassen- und -arten. Solche Datenbanken wurden bereits erstellt und werden ständig für alle landwirtschaftlich bedeutenden Arten wie Rinder, Schweine, Schafe, Ziegen, Pferde, Hühner und Bienen ergänzt. Die Forschungsthemen auf dem Gebiet der DNA-Technologien umfassen Fragen der Analyse des Genoms, Untersuchungen zur Biodiversität, Fragen der Identifizierung und nachträglicher Nutzung zur Selektion von Genen, welche die erhöhte Produktivität und verbesserte Immunität gegen Erkrankungen beeinflussen.

Zur genetischen Verbesserung russischer Nutztierassen werden internationale Zuchttiere eingesetzt, um den einheimischen Genpool durch Einbeziehung der besten weltweiten Selektionsfortschritte zu optimieren. Der Import von Zuchtmaterial aus dem Ausland soll nicht zur unkontrollierten Verbreitung von Erbdefekten in unseren Zuchttierpopulationen führen. Die dramatische Verringerung der effektiven Populationsgrößen begünstigt bei Zuchtrindern die Verbreitung von rezessiv vererbten Erbdefekten ohnehin.

Derzeit umfasst die OMIA (*Online Mendelian Inheritance in Animals*)-Datenbank erbliche Defekte von 186 Nutztierarten. Die Datenbank enthält phänotypische Beschreibungen von 400 Erbkrankheiten beim Rind, und 221 Erbkrankheiten beim Schwein und Schaf. 145, 45 und 42 dieser Erbkrankheiten sind durch eine Mutation in einem Genlocus bedingt. 79, 18 bzw. 17 Erbdefekte des Rindes, des Schweines und des Schafes sind auf molekulargenetischer Ebene beschrieben.



Die in Tabelle 1 aufgelisteten Erbdefekte bei Holstein-Friesian-Rindern, Schweinen und Schafen wurden aus der OMIA-Datenbank ausgewählt, weil sie für die russische Tierzucht relevant sind.

Tab. 1 Erbdefekte und deren ursächliche Mutationen bei Nutztieren

Tierart	Gen (ID*)	Mutation	Erbdefekt
Rind	SLC35A3 (23443)	G→T (180)	Komplexe vertebrale Missbildung, CVM (TV-CVM-frei, CV-CVM-Träger)
	ITGB2 (281877)	A→G (383)	Bovine Leukozyten-Adhäsionsdefizienz, BLAD (TL-BLAD-frei, BL-BLAD-Träger)
	FANCI (522442)	Del3.3kb	Brachyspina-Syndrom, BS (TY-frei, BY-Brachyspina-Träger)
	UMPS (281568)	T→C (1247)	Defizienz der Urinmonophosphat-Synthetase, DUMPS (TD-frei, DP-DUMPS-Träger)
	FXI (407998)	Ins76bp (Exon 3)	Blutgerinnungsfaktor XI-Mangel, FXID
	SLC39A4 (510951)	T→C (Intron10)	Bovine hereditäre Zinkdefizienz, BHZD
Schwein	PRKAG3 (397149)	G→A (200)	Rendement Napole
	RYR1 (396718)	C→T (1843)	Maligne Hyperthermie, MH
	SPEF2 (733620)	Ins9,0 kb (Intron 30)	ISTS-Syndrom ( <i>Short-Tail Sperm Defect</i> )
Schafe	PRNP (326330)	136 (A/V/T) und 154 (R/H) 171 (R/H/Q/K) (Exon 3)	PRNP-Gene (Scrapie-charakteristisches VRQ-Allel)

Die Eliminierung bzw. Reduzierung rezessiv vererbter Erbkrankheiten in den russischen Populationen landwirtschaftlicher Tiere erfordert die Einführung von DNA-Identifizierungssystemen für Anlageträger. Hier berichten wir über einige für die Tierzucht in Russland bedeutsame Ergebnisse dieser Forschungen. Die wichtigsten Milchrinderrassen, die für die Milchproduktion in Russland vorwiegend benutzt werden, sind Holstein-Friesian und Schwarzbunte. An Hand von Untersuchungen der reinrassigen und der mit Holstein-Friesian veredelten Rinderpopulationen zeigte sich, dass die Kreuzungen mit Holstein-Frie-

sian zu einer Verringerung der genetischen Vielfaltigkeit, zur Verarmung des Genpools und zu einer größeren Homogenität des Genpools der russischen Rinderrassen geführt haben (Abb. 1).

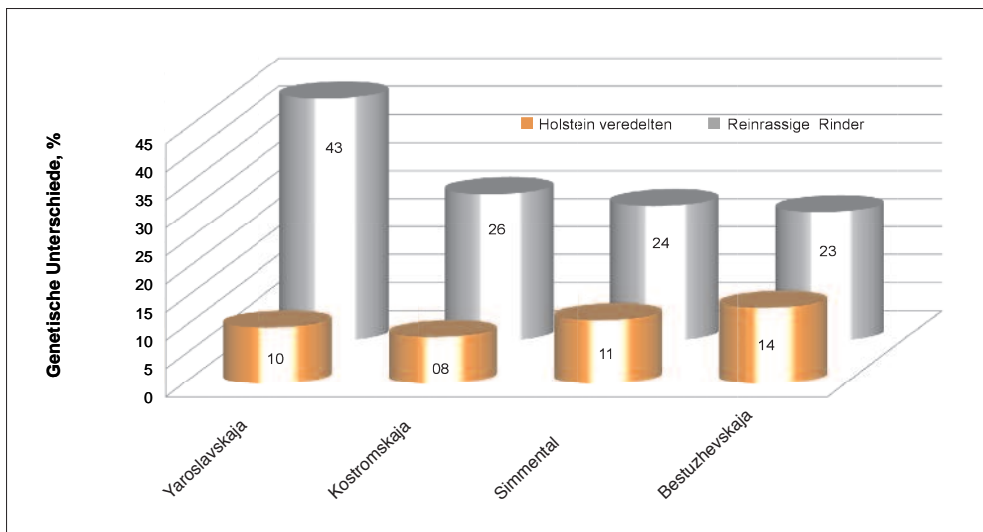


Abb. 1 DNA-Analysen russischer Rinderrassen

Es wurde festgestellt, dass die Häufigkeit rezessiver Anlageträger beim Rind relativ niedrig ist: von 0 % für den Blutgerinnungsfaktor XI-Mangel (FXID) und die Bovine hereditäre Zinkdefizienz (BHZD) bis zu 2,1 % für die Komplexe vertebrale Missbildung (CVM).

Als Beispiel für die erfolgreiche Kontrolle und Eliminierung von Erbkrankheiten, die dank der Einführung einer DNA-Diagnostik umgesetzt werden konnten, werden die komplexe vertebrale Missbildung (SLC35A3) und die Bovine Leukozyten-Adhäsionsdefizienz (BLAD) dargestellt.

In mehrjährigen Forschungsarbeiten mit Zuchtbullen und Jungrindern, die von 45 Zuchtbetrieben der Russischen Föderation stammten, wurde der Stieranteil von Anlageträgern des für komplexe vertebrale Missbildung verantwortlichen mutanten Allels SLC35A3 von 5,06 % im Jahr 2005 auf 0,2 % im Jahr 2008 reduziert. Eine geringe Erhöhung des Anteils der Anlageträger in den Jahren 2009 und 2010 auf jeweils 2,74 und 1,66 % war vermutlich mit der Einführung der künstlichen Besamung verbunden, als Spermia von bestimmten importierten Zuchtbullen, die Anlageträger dieses Defektes waren, zum Einsatz kam. Bei den im Jahr 2012 untersuchten Bullen wurden keine Tiere mit komplexer vertebraler Missbildung (SLC35A3) mehr gefunden.

Anhand der Ergebnisse der im Zeitraum 2005 bis 2012 durchgeführten DNA-Diagnostik wurde die Dynamik von Auftrittshäufigkeiten versteckter BLAD-Träger beurteilt. Die Datenanalyse zeigte ungefähr den gleichen Anteil an BLAD-Anlageträgern (2,13 bis 2,53 % in den Jahren 2005 bis 2009). In den Jahren 2010 bis 2011 sank die Frequenz auf 0,71 bis 1,04 % und im Jahr 2012 auf 0 %. Bei den 248 im Jahr 2012 untersuchten Bullen wurde kein BLAD-Anlageträger mehr gefunden (Abb. 2).

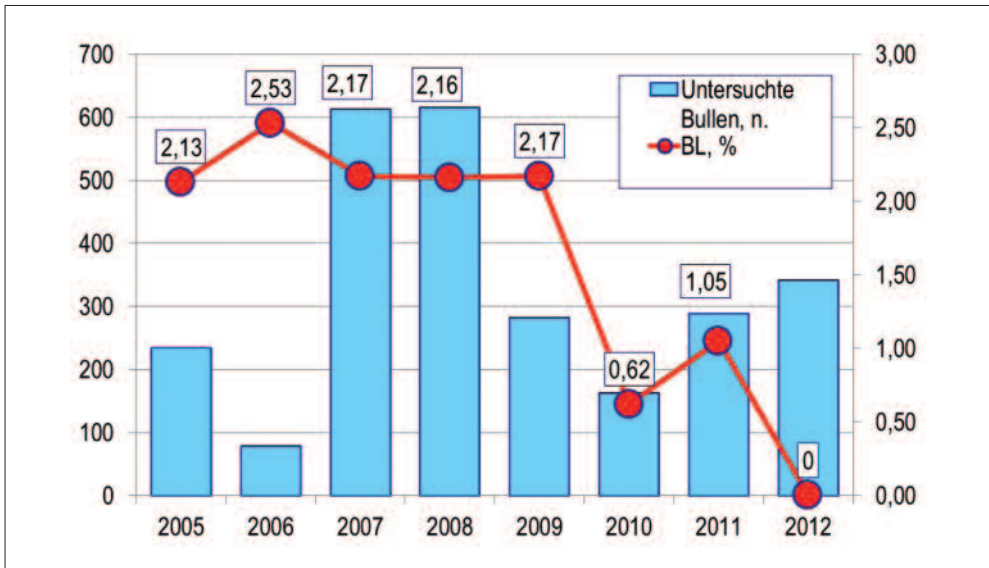


Abb. 2 Frequenz der BLAD-Anlageträger in den Jahren 2005 bis 2012

Die Schweinefleischproduktion in Russland beruht auf einigen wenigen Schweinerassen, wie Große Weiße (Yorkshire), Landrasse, Duroc und – in geringerem Ausmaß – Pietrain. Im Zentrum für Biotechnologie und molekulare Diagnostik beim VIG wurde eine ständig ergänzte DNA-Bank mit DNA von Zuchtschweinen verschiedener Rassen angelegt. Derzeit sind dort mehr als 18000 DNA-Proben aus 74 Populationen von 20 Schweinerassen eingelagert. In der Bank sind die DNA-Proben von den Zuchtschweinen sowohl aus russischer Zucht als auch von führenden Zuchtbetrieben in Kanada, Frankreich, Irland, Finnland, Norwegen, Großbritannien, Holland und einigen anderen Länder eingelagert. Die Proben aus dieser DNA-Bank wurden für die experimentelle Prüfung unserer diagnostischen DNA-Verfahren herangezogen.

Im untersuchten Zuchtschweinebestand betrug die Häufigkeit des MH-Syndroms 2,11 %. Anlageträger für Maligne Hyperthermie (MH) wurden in allen untersuchten Schweinerassen identifiziert (Abb. 3). Ihr Anteil betrug 1,97 % für Große Weiße und Yorkshire (n = 1920), 1,49 % für Landrasse (n = 1606), 2,97 % für Duroc (n = 437) und 10,00 % für Pietrain (n = 50). Außerdem wurden bei Pietrainschweinen 6,0 % homozygote MH-Träger identifiziert. In anderen Rassen fehlten Merkmalsträger. Schweinestress (PS)-Syndrom-Anlageträger konnten nicht identifiziert werden.

Ein anderes Beispiel für die praktische Umsetzung molekulargenetischer Diagnostikverfahren für Erbkrankheiten in der russischen Schweinezucht, die als Ergänzung zu den bereits eingeführten Verfahren für Maligne Hyperthermie (MH) und das Schweinestress (PS)-Syndrom zum Einsatz kamen, ist der ab dem Jahr 2010 entwickelte und eingeführte DNA-Test zur Identifizierung von *Short-Tail-Sperm-Defect* (ISTS)-Anlageträgern. Das ISTS-Syndrom ist ein Erbdefekt, der zur Bildung von Spermien mit verkürzten Spermenschwänzen und damit zu einer reduzierten Fertilität der Eber führt und für die Rassen Große Weiße und Yorkshire aus skandinavischer Abstammung spezifisch ist. Alle identifizierten Anlageträger dieser Erbkrankheit wurden von der Zucht ausgeschlossen.

In der Schafzucht wurde zum Rassen- und Populationenmonitoring des Prion-Genes (PRNP-Gen) und zur Entwicklung von Maßnahmen zur Eliminierung des VRQ-Allels von 1336 reinrassigen Tieren, 23 Populationen, 13 Rassen in Russland und 32 Schneeschaaf-Kreuzungen genotypisiert.

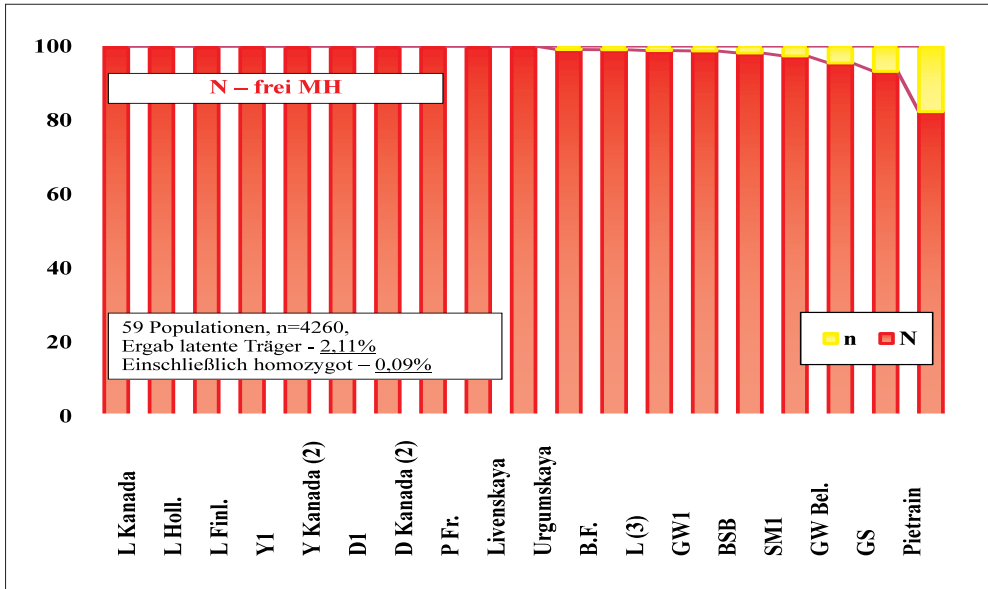


Abb. 3 Anlageträger für MH bei verschiedenen Schweinerassen in Russland

In 8 von 13 Schafrassen wurde das VRQ-Allel diagnostiziert (Abb. 4). Die Auftretshäufigkeit dieses mutanten, für die Scrapie kodierenden Allels, lag zwischen 1,6% und 10,8% bei Romney-Marsh- und Zygai-Schafrassen. Die Askanische, Kutschugurovische, Karakul-, Eadilbaevische und Kalmückische Schafrasse waren frei vom VRQ-Allel.

Unerwünschte VRQ-Allele für jene für die Scrapie-Anlage charakteristischen VRQ/XXX-Haplotypen, die in Abhängigkeit vom zweiten Allel zu der genetischen Risikogruppe G4 oder G5 führen, wurden in 5 von 7 Romanov-Populationen identifiziert (Tab. 2). Die höchste Auftretshäufigkeit (11,8%) dieses Allels wurde in einer Population beobachtet, wo früher im Laufe der Züchtung Romanov-Schafe mit Kamtschatkischen Schneeschaafen und deren Kreuzungen gekreuzt worden waren.

Wir konnten zeigen, dass in den drei regionalen Schafrassen ROM4, ROM1 und ROM6 die Häufigkeit des für Scrapie kodierenden Allels weniger als 3% betrug (1,11%, 2,04% und 2,08%), was zweifellos auf die verborgenen Genpool-Reserven der Populationen schließen lässt. Durchschnittlich betrug die Häufigkeit des VRQ-Haplotyps für die Romanovrasse 3,44% und für die Kreuzungen mit dem Schneeschaaf 10,94%.

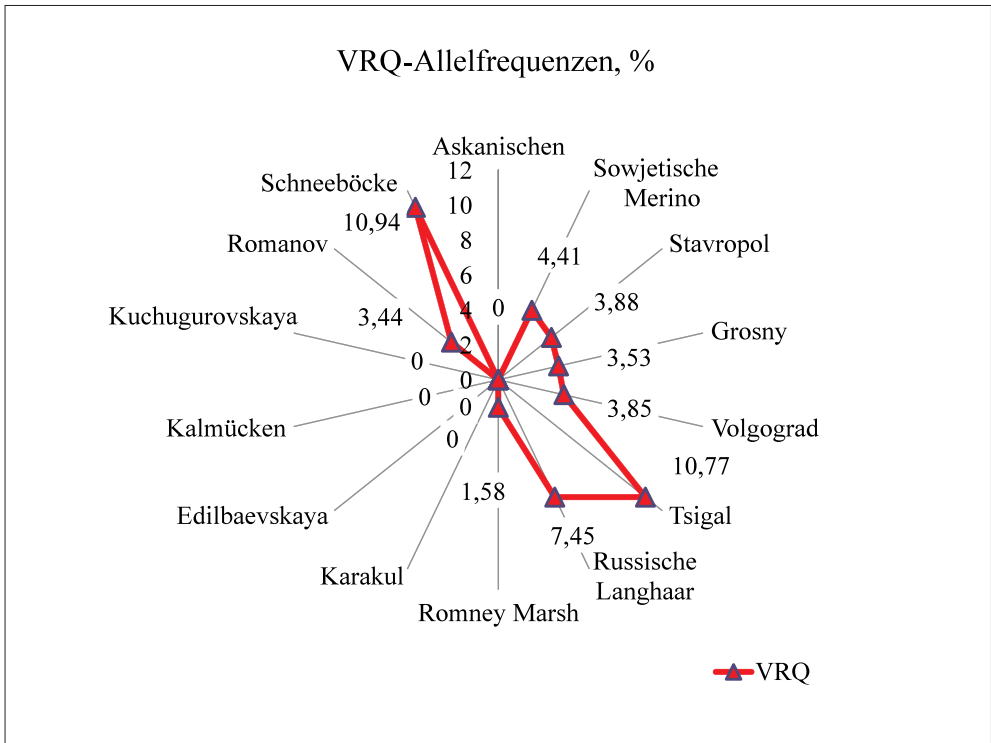


Abb. 4 Populationsmonitoring des Prion-Gens bei Schafzrassen in Russland

Tab. 2 Auftretshäufigkeit des VRQ-Allels und des VRQ-Haplotyps bei Romanov-Schafen

Romanov- Rasse Gruppen	Genetische Risikogruppen (Angaben in %)				
	G1 ARR/ARR ARR/AHQ	G2 ARR/ARQ, AHQ/ARQ, AHQ/AHQ	G3 ARQ/ARQ,	G4 ARR/VRQ VRQ/AHQ	G5 VRQ/ARQ,
ROM1	7,14	40,82	47,96	1,02	3,06
ROM2	4,44	40,00	55,56	0	0
ROM3	2,84	20,85	65,88	1,42	9,01
ROM4	0	20,00	77,80	0	2,20
ROM5	0	20,00	77,80	0	2,20
ROM6	0	4,35	95,65	0	0
ROM7	0	4,17	91,66	0	4,17
Durchschnitt	3,08	24,05	66,00	0,72	6,15
Schneebock- Kreuzungen	0	0	78,13	0	21,87

In Anbetracht der weitverbreiteten Verwendung der künstlichen Besamung in der Rinder-, Schweine- und auch Schafzucht kann der Einsatz eines Anlageträgers zur Verbreitung dieses Erbdefektes in der ganzen Population führen. Die von uns erarbeiteten Daten verdeutlichen, dass die Einführung der DNA-Diagnostik eine perfekte Möglichkeit zur Kontrolle und Eliminierung der Erbdefekte in den Zuchttierpopulationen Russlands ist.

Prof. Dr. biol. Sci. Natalia ZINOVIEVA  
Deputy Director for Science  
All-Russian State Research Institute of Animal Breeding  
of the Russian Academy of Agricultural Science  
Dubrovitsy settlement 60  
Podolsk District  
Moscow Region  
142132 Russia  
Tel.: +7 4967 651404  
Fax: +7 4967 651151, 651101  
E-Mail: n\_zinovieva@mail.ru

## Das Management von „neuen“ Erbkrankheiten beim Fleckvieh

Hubert PAUSCH, Simone JUNG und Ruedi FRIES (Freising)

### *Zusammenfassung*

Der starke Einsatz einzelner weniger Elitebullen in der künstlichen Besamung macht Rinderpopulationen anfällig gegenüber dem Auftreten von rezessiv vererbten Krankheiten. Stark nachgefragte Bullen können binnen kürzester Zeit mehrere Zehntausend Nachkommen erzeugen. Dadurch kann die Frequenz von Schadallelen innerhalb weniger Generationen stark ansteigen. Das landläufige Bild von Erbkrankheiten ist geprägt durch Missbildungen neugeborener Kälber. Jedoch existieren auch rezessive Varianten, deren Phänotyp sich erst im Laufe des späteren Lebens offenbart und sich zum Beispiel in höheren Aufzuchtverlusten manifestiert. Die Problematik dieser Erkrankungen liegt darin, dass sie über das klassische perinatale Erbfehlermonitoring nicht zu erfassen sind. Die Verfügbarkeit von umfangreichen Genotypisierungsdaten ermöglicht es, nun auch diese Merkmale zu identifizieren. Werden zusätzlich populationsweite Re-Sequenzierungsdaten verwendet, steht ein schlagkräftiger Ansatz für das pro-aktive Management von diesen unerwünschten Eigenschaften zur Verfügung.

### *Abstract*

The intense use of a small number of elite sires *via* artificial insemination makes cattle populations very susceptible to the propagation of recessive disorders. Individual bulls may generate tens of thousands of progeny within a very short time, and the frequency of deleterious alleles might increase rapidly. In the general perception, hereditary diseases manifest themselves perinatally in malformations of newborns. However, recessive disorders might also be associated with an increased juvenile mortality. Such diseases cannot be identified by the classical perinatal monitoring. However, the availability of comprehensive genotype data enables the rapid identification of such disorders without relying on phenotype information. High density genotypes combined with population-scale re-sequencing data offer powerful approaches to a pro-actively management of undesired characteristics.

### **1. Erbkrankheiten in Nutztierpopulationen**

Typisch für Nutztierpopulationen sind ausgeprägte Verwandtschaftsbeziehungen und relativ niedrige effektive Populationsgrößen. Beim Fleckvieh beträgt die effektive Populationsgröße etwa 160 (PAUSCH et al. 2013) und ist damit deutlich größer als in anderen Rinderpopulationen (STACHOWICZ et al. 2011). Die intensive züchterische Bearbeitung führt jedoch zu einer kontinuierlichen Reduktion der effektiven Populationsgröße. Ein Großteil der genetischen Variation der heutigen Fleckvieh-Population kann auf einige wenige Schlüsseltiere zurückverfolgt werden (JANSEN et al. 2013).

Der Verlust an genetischer Diversität korreliert mit einem Anstieg der Inzucht. Dementsprechend finden sich lange abstammungsgleiche Regionen, sogenannte „runs of homozygosity“, im Genom vieler Nutztiere (FERENCAKOVIC et al. 2011). Aufgrund dieser Strukturen sind Nutztierpopulationen sehr anfällig gegenüber dem Auftreten von rezessiven Krankheiten.



Beim Rind sind derzeit rund 180 rezessive Merkmale bekannt (NICHOLAS und HOBBS 2013), viele weitere dürften in absehbarer Zeit hinzukommen.

Rezessive Merkmale manifestieren sich nur dann phänotypisch, wenn der Genort reinerbig (= homozygot) vorliegt. Daher können rezessive Schädallele über Generationen in einer Population unerkannt persistieren, ohne phänotypisch zur Ausprägung zu kommen. Erst wenn die Frequenz des schädlichen Allels ansteigt und gehäuft unwissentlich Anlageträger miteinander angepaart werden, wird der Phänotyp offenkundig.

Das landläufige Bild von Erbkrankheiten ist geprägt durch Missbildungen neugeborener Kälber. Beispielhaft dafür ist die Spinnengliedrigkeit beim Fleckvieh (BUIJKAMP et al. 2011) und Braunvieh (DRÖGEMÜLLER et al. 2010). Betroffene (= homozygote) Kälber weisen charakteristische Missbildungen an den Extremitäten und am Kopf auf und sind in aller Regel nicht lebensfähig (BUIJKAMP et al. 2008). Über das klassische Erbfehlermonitoring können Landwirte Kälber mit angeborenen Missbildungen melden. Treten gehäuft Missbildungen bei den Nachkommen bestimmter Bullen auf, ist das als Hinweis auf einen rezessiven Erbgang zu werten.

## 2. Aufklärung von Erbkrankheiten mit Hochdurchsatztechnologien

Die Entwicklung von Genotypisierungsarrays, mit denen Genotypen für mehrere Zehntausend polymorphe Positionen im Hochdurchsatzverfahren abgefragt werden können, ermöglicht die rasche Aufklärung von Erbkrankheiten (CHARLIER et al. 2008). Meist werden dafür die Genotypen einiger weniger betroffener Individuen in Fall-/Kontroll-Studien mit den Genotypen phänotypisch gesunder Individuen kontrastiert. Auf diese Weise können ursächliche Genomregionen sehr präzise lokalisiert werden. Im weiteren Verlauf werden positionelle Kandidatengene nach kompatiblen Mutationen durchforstet, z. B. über die Sequenzierung einzelner Gene (z. B. SARTELET et al. 2012), über die Anreicherung und parallele Sequenzierung spezifischer Genomabschnitte (z. B. DRÖGEMÜLLER et al. 2010) oder über die Sequenzierung wichtiger Gründertiere einer Population (JANSEN et al. 2013). Diese Ansätze haben sich in den vergangenen Jahren in vielen Spezies bewährt (NICHOLAS und HOBBS 2013).

## 3. Das Auftreten „neuer“ Erbkrankheiten beim Fleckvieh

Die Phänotypen der meisten bislang identifizierten Erbkrankheiten werden unmittelbar nach der Geburt offenkundig. Unter „neuen“ Erbkrankheiten verstehen wir angeborene Anomalien, deren Phänotyp sich erst im Laufe der Aufzucht manifestiert. Das Auftreten pathologischer Symptome und die Geburt sind zeitlich voneinander getrennt, so dass ein genetischer Hintergrund nicht unmittelbar in Betracht gezogen wird. Derartige Phänomene konnten bereits beim Rind identifiziert werden (z. B. Bovine Leukozyten-Adhäsionsdefizienz [BLAD], SHUSTER et al. 1992), allerdings nicht beim Fleckvieh.

Über genomweite Analysen konnte ein Gendefekt beim Fleckvieh lokalisiert werden, der im homozygoten Zustand zu drastisch reduzierter Fruchtbarkeit bei Bullen führt (männliche Subfertilität, PAUSCH et al. 2014). Alle routinemäßig erfassten Ejakulatparameter (Ejakulatmenge, Spermienkonzentration, Motilität, Vitalität) sind unauffällig, so dass subfertile Bullen

bislang nicht frühzeitig erkannt und von der Zucht ausgeschlossen werden konnten. Über die Analyse von umfangreichen Sequenzdaten konnte die ursächliche Mutation in einem Gen lokalisiert werden (*TMEM95*), das für ein bislang nicht näher charakterisiertes Transmembranprotein kodiert (PAUSCH et al. 2014). Nach bisherigen Erkenntnissen ist kein negativer Effekt bei weiblichen Tieren nachweisbar. Bis auf die mangelhafte Fruchtbarkeit sind auch homozygote Bullen vollkommen gesund. Die männliche Subfertilität ist ein Beispiel für einen Gendefekt, der nur in einem Bruchteil der Population (den Zuchtbullen) von Bedeutung ist. Homozygote Bullen können nun frühzeitig identifiziert werden und gelangen nicht in den Besamungseinsatz.

Ein weiteres Beispiel für eine „neue“ Erbkrankheit beim Fleckvieh ist eine schwere Hauterkrankung, deren Symptomatik einer erblichen Zinkaufnahmestörung ähnelt (MACHEN et al. 1996). Betroffene (= homozygote) Kälber werden phänotypisch gesund geboren, zeigen aber bereits in den ersten Lebenswochen eine erhöhte Anfälligkeit für unspezifische Erkrankungen der Lungen und des Magen-Darm-Trakts. Im Alter von vier bis acht Wochen entwickeln sich typische krankhafte Hautveränderungen. Der Allgemeinzustand betroffener Kälber verschlechtert sich kontinuierlich und führt letztendlich zum Tod. Bislang scheiterten alle Therapieansätze. Über genomweite Analysen und die Sequenzierung eines betroffenen Kalbes konnte die ursächliche Mutation identifiziert und ein direkter Gentest implementiert werden (JUNG et al. 2014). Durch die niedrige Frequenz des Defektalleles traten nur sehr wenige Fälle auf. Aufgrund der unspezifischen und späten Manifestierung der Symptomatik können solche Erkrankungen nicht über das perinatale Erbfehlermonitoring entdeckt werden.

Die dritte „neue“ Erbkrankheit beim Fleckvieh ist eine angeborene Blutgerinnungsstörung (= Thrombopathie). Zwar sind angeborene Blutgerinnungsstörungen beim Rind schon länger bekannt (BOUDREAUX et al. 2007), allerdings gab es bis vor wenigen Jahren keine Hinweise, dass auch Fleckvieh betroffen sein könnte. Im Rahmen der Untersuchungen zur bovinen neonatalen Panzytopenie (BNP, SAUTER-LOUIS et al. 2012) wurden Kälber mit spontan auftretenden Blutungen offenkundig, deren Blutbilder sich deutlich von den typischen BNP-Fällen unterschieden. Bei diesen Kälbern war trotz einer normalen Anzahl und keinerlei pathologischer Veränderungen der Thrombozyten die Blutgerinnung stark beeinträchtigt. Über genomweite Analysen konnten wir zeigen, dass diese Kälber an einer erblichen Blutgerinnungsstörung leiden (JANSEN et al. 2013), wie sie bereits beim kanadischen Simmental beschrieben wurde (BOUDREAUX et al. 2007). Obwohl die genetische Ursache der Blutgerinnungsstörung aufgeklärt werden konnte, sind die Auslöser der Blutungsepisoden sowie die Ursachen der variablen Intensität der Blutungen bisher noch unklar.

#### **4. Der Umgang mit „neuen“ Erbkrankheiten im Zuchtprogramm**

Im Zeitalter der genomischen Evaluierung von Populationen (MEUWISSEN et al. 2001, VANRADEN et al. 2011) ermöglicht die flächendeckende Genotypisierung aller Selektionskandidaten einen pro-aktiven Umgang mit Erbkrankheiten. Der Trägerstatus aller Bullen ist bekannt. Je nach Schwere und Häufigkeit der Erkrankung ergeben sich unterschiedliche Handlungsempfehlungen. Homozygote Träger der männlichen Subfertilität können nun frühzeitig erkannt und vom Besamungseinsatz ausgeschlossen werden. Da weibliche Tiere keinerlei Beeinträchtigungen aufweisen und auch homozygote Bullen gesund sind, besteht derzeit kein Anlass, den Einsatz von Anlageträgern zu reglementieren. Anders verhält es sich beim Zinkdefizienz-

ähnlichen Syndrom. Da homozygote Tiere massiv leiden, sollen Anlageträger zukünftig konsequent aus der Zucht ausgeschlossen werden. Aufgrund der sehr niedrigen Allelfrequenz (<1 %) sind die Auswirkungen auf das Zuchtprogramm überschaubar. Eine derart radikale Strategie scheint bei der Thrombopathie nicht angebracht. Die Allelfrequenz ist deutlich höher (~4–6 %), und der Ausschluss aller Anlageträger hätte negative Auswirkungen auf die genetische Vielfalt und den Zuchtfortschritt der gesamten Population. Um dennoch die Entstehung homozygoter Kälber zu verhindern, müssen Anpaarungsstrategien entwickelt werden, damit Risikoanpaarungen zukünftig vermieden werden können.

## Literatur

- BOUDREAU, M. K., SCHMUTZ, S. M., and FRENCH, P. S.: Calcium diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor 1 (CalDAG-GEFI) gene mutations in a thrombopathic Simmental calf. *Vet. Pathol.* **44**, 932–935 (2007)
- 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)
- BUITKAMP, J., SEMMER, J., and GÖTZ, K.-U.: Arachnomelia syndrome in Simmental cattle is caused by a homozygous 2-bp deletion in the molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (MOC51). *BMC Genet.* **12**, 11 (2011)
- 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., 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**/8, e1001079 (2010)
- FERENCAKOVIC, M., HAMZIC, E., GREDLER, B., CURIK, I., and SÖLKNER, J.: Runs of homozygosity reveal genome-wide autozygosity in the Austrian Fleckvieh cattle. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **76**, 325–329 (2011)
- JANSEN, S., AIGNER, B., PAUSCH, H., WYSOCKI, M., ECK, S., BENET-PAGÈS, A., GRAF, E., WIELAND, T., STROM, T. M., MEITINGER, T., and FRIES, R.: Assessment of the genomic variation in a cattle population by re-sequencing of key animals at low to medium coverage. *BMC Genomics* **14**, 446 (2013)
- JUNG, S., PAUSCH, H., GOLLNICK, N. S., LANGENMAYER, M. C., BUITKAMP, J., EDEL, C., GÖTZ, K.-U., and FRIES, R.: A nonsense mutation in PLD4 causes the bovine hereditary zinc deficiency-like syndrome in Fleckvieh cattle *BMC Genomics* **15**, 623 (2014)
- MACHEN, M., MONTGOMERY, T., HOLLAND, R., BRASELTON, E., DUNSTAN, R., BREWER, G., and YUZBASIVAN-GURKAN, V.: Bovine hereditary zinc deficiency: lethal trait A 46. *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**, 219–227 (1996)
- MEUWISSEN, T. H., HAYES, B. J., and GODDARD, M. E.: Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* **157**, 1819–1829 (2001)
- NICHOLAS, F. W., and HOBBS, M.: Mutation discovery for Mendelian traits in non-laboratory animals: a review of achievements up to 2012. *Anim. Genet.* **45**/2, 157–170 (2013)
- PAUSCH, H., AIGNER, B., EMMERLING, R., EDEL, C., GÖTZ, K.-U., and FRIES, R.: Imputation of high-density genotypes in the Fleckvieh cattle population. *Genet. Sel. Evol.* **45**, 3 (2013)
- PAUSCH, H., KÖLLE, S., WURMSER, C., SCHWARZENBACHER, H., EMMERLING, R., JANSEN, S., TROTTMANN, M., FUERST, C., GÖTZ, K.-U., and FRIES, R.: A nonsense mutation in TMEM95 encoding a nondescript transmembrane protein causes idiopathic male subfertility in cattle. *PLoS Genet* **10**, e1004044 (2014)
- SARTELET, A., DRUET, T., MICHAUX, C., FASQUELLE, C., GÉRON, S., TAMMA, N., ZHANG, Z., COPPIETERS, W., GEORGES, M., and CHARLIER, C.: A splice site variant in the bovine RNF11 gene compromises growth and regulation of the inflammatory response. *PLoS Genet.* **8**, e1002581 (2012)
- SAUTER-LOUIS, C., CARLIN, A., FRIEDRICH, A., ASSAD, A., REICHMANN, F., RADEMACHER, G., HEUER, C., and KLEE, W.: Case control study to investigate risk factors for bovine neonatal pancytopenia (BNP) in young calves in southern Germany. *Prev. Vet. Med.* **105**, 49–58 (2012)
- 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)

*Das Management von „neuen“ Erbkrankheiten beim Fleckvieh*

STACHOWICZ, K., SARGOLZAEI, M., MIGLIOR, F., and SCHENKEL, F. S.: Rates of inbreeding and genetic diversity in Canadian Holstein and Jersey cattle. *J. Dairy Sci.* *94*, 5160–5175 (2011)

VANRADEN, P. M., O'CONNELL, J. R., WIGGANS, G. R., and WEIGEL, K. A.: Genomic evaluations with many more genotypes. *Genet. Sel. Evol.* *43*, 10 (2011)

Dr. Hubert PAUSCH  
Lehrstuhl für Tierzucht  
Technische Universität München  
Liesel-Beckmann-Straße 1  
85354 Freising-Weihenstephan  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 8161 713743  
Fax: +49 8161 713107  
E-Mail: [Hubert.Pausch@tierzucht.tum.de](mailto:Hubert.Pausch@tierzucht.tum.de)

## **Forschung und Verantwortung im Konflikt?**

Ethische, rechtliche und ökonomische Aspekte der Totalsequenzierung  
des menschlichen Genoms

Symposium

vom 15. bis 16. März 2012 in Heidelberg

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 117, Nr. 396

Herausgegeben von Felicitas ECKRICH und Klaus TANNER (Heidelberg)

(2013, 132 Seiten, 5 Abbildungen, 3 Tabellen, 20,95 Euro,

ISBN: 978-3-8047-3241-4)

Die Möglichkeit, das komplette Genom von Individuen zu sequenzieren, ist seit einigen Jahren vorhanden und wird stetig weiterentwickelt. Damit werden nicht nur neue Diagnose- und Therapieformen zukünftig verfügbar, sondern es gelangen auch gesellschaftliche Probleme und neue ethische Fragen in den Fokus. Die ethischen und rechtlichen Aspekte der Totalsequenzierung des menschlichen Genoms bedürfen vor diesem Hintergrund einer wohlgedachten interdisziplinären Auseinandersetzung. Die Beiträge des Bandes beleuchten den Konflikt zwischen Forschungsdynamik, ärztlichem Handeln und Patientenversorgung aus verschiedenen Perspektiven und wollen Orientierungspunkte für die aktuelle Debatte sein. Das Spektrum der Ansätze reicht von gesundheitsökonomischen und gesellschaftswissenschaftlichen Überlegungen über Regulierungsfragen bis zu grundlegenden ethischen Reflexionen.

## Umgang mit Erbfehlern in der Holsteinzucht in Deutschland

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

Mit 1 Abbildung und 4 Tabellen

### Zusammenfassung

In der Holsteinzucht mussten die wichtigen Erbfehler der letzten Jahre, namentlich BLAD (*Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency*), CVM (*Complex Vertebral Malformation*) und, aktuell, Brachyspina, die sämtlich auf den engen Genpool der internationalen Holsteinzucht zurückgehen (BLAD: Osborndale Ivanhoe, Carlin-M Ivanhoe Bell; CVM: Carlin-M Ivanhoe Bell; Brachyspina: Sweet-Haven Tradition) auch in der deutschen Population bekämpft werden. Der Umgang der deutschen Holsteinzucht mit auftretenden Erbdefekten kann exemplarisch für die drei Defekte BLAD, CVM und Brachyspina als verantwortungsbewusst bezeichnet werden. Nach Verfügbarkeit eines Gentests finden sich in späteren Geburtsjahrgängen nur extrem wenige bzw. keine Bullen mehr, welche als Testbullen in den Einsatz gekommen sind. In einer retrospektiven Studie an den Ergebnissen der Zuchtwertschätzung Holstein wurde der Effekt des Vorhandenseins eines Schadallels bei Bullen („Anlageträger“) auf die geschätzten Zuchtwerte in den Merkmalskomplexen Milchleistung, Exterieur, Nutzungsdauer, Zellzahl, Reproduktionsmerkmale und Abkalbmerkmale untersucht. Hinsichtlich von BLAD-Anlageträgern zeigt sich ein signifikanter Effekt für den Relativzuchtwert Zellzahl, der somit darauf hinweist, dass heterozygote Kühe offensichtlich krankheitsanfälliger sind. Für CVM-Anlageträger können hochsignifikante Effekte auf Merkmale der Fruchtbarkeit der Töchter gefunden werden. Analog gilt dies auch für Brachyspina, wobei aber fraglich erscheint, ob diese Effekte allein auf Frühaborte bei der Anpaarung von heterozygoten Kühen und anderen Merkmalsträgern zurückgehen. Vielmehr muss wohl angenommen werden, dass schon heterozygote Kühe, auch bei Anpaarung an „gesunde“ Bullen, eine verminderte Konzeptionsleistung zeigen.

### Abstract

In the Holstein breed, the most important genetic defects of recent years, namely BLAD (*Bovine leukocyte adhesion deficiency*), CVM (*Complex vertebral malformation*) and, most recently, Brachyspina, which all originated from the tight gene pool of this international breed (BLAD: Osborndale Ivanhoe, Carlin-M Ivanhoe Bell; CVM: Carlin-M Ivanhoe Bell; Brachyspina: Sweet-Haven Tradition) had also to be dealt with in the German population. For the examples of the three genetic defects mentioned, the way of handling genetic defects can be assessed as a responsible way of handling the problem. Right after the availability of genetic testing only very few if not zero young bulls can be found that have entered a progeny test. In a retrospective study based on the results of the officially estimated breeding values for Holstein bulls, the effect of the deleterious allele found in carrier bulls was estimated for the complexes milk production, conformation, longevity, somatic cell score, reproduction, and calving traits. Concerning BLAD carriers, a significant effect to the disadvantage of carriers can be found for somatic cell score. Thus, heterozygous cows (carriers) appear to be more susceptible to udder diseases. For CVM carriers, lower and highly significant estimated breeding values for daughter fertility were observed. The analysis for Brachyspina revealed analogous results for daughter fertility. It has to be questioned whether these findings solely are the outcome of matings of carrier daughters to further carriers which result in abortions. Rather, it has to be assumed that carrier daughters exhibit lower conception rates, even when mated to homozygous healthy bulls.

### 1. Einführung

Die Zucht des Holsteinrindes in Deutschland ist gekennzeichnet durch eine enge Einbindung in die internationale Holsteinzucht, wobei aber ganz deutlich ein eigenständiges Zuchtziel ver-

folgt wird. Dies wirkt sich auch insbesondere so aus, dass mittlerweile der Anteil an importiertem Sperma (vornehmlich aus den USA und Kanada) immer weiter zurückgegangen ist, so dass wichtige Bullen der Holsteinzucht Nordamerikas zwar teilweise als Bullenväter, jedoch nur selten intensiv direkt in Deutschland eingesetzt werden. Dies hat eine große Bedeutung für die Bekämpfung von Erbfehlern bzw. für das Vorhandensein von Schadallelen in der deutschen Population. Die wichtigen Erbfehler der letzten Jahre, namentlich BLAD (*Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency*), CVM (*Complex Vertebral Malformation*) und, aktuell, Brachyspina, die sämtlich auf den engen Genpool der internationalen Holsteinzucht zurückgehen, mussten auch in der deutschen Holsteinzucht bekämpft werden.

Alle genannten Erbfehler sind monogen bedingt und zeigen einen dominant/rezessiven Erbgang, d.h., nur die homozygot rezessiven Genotypen sind betroffen – und meist auch nicht lebensfähig – während die Anlageträger (heterozygot) phänotypisch nicht erkannt werden können und gesund erscheinen. Regelmäßig wiederholt sich bei derartigen Erbfehlern folgende Kette von Abläufen: Auf der Phänotypebene werden erkrankte Tiere bzw. nicht lebensfähige Individuen beobachtet, das Krankheitsbild wird beschrieben, erste Pedigreeanalysen weisen auf Häufungen bei bestimmten Linien oder wichtigen Bullen hin, wissenschaftliche Arbeitsgruppen beginnen Projekte auf der Basis von DNA-Material der erkrankten Familien, schließlich wird das kausale Gen eingekreist, die Mutation identifiziert und ein Gentest für die Zuchtpraxis zur Verfügung gestellt.

Die Vorgehensweise auf molekularer Ebene umfasst dabei heute meist zunächst die Analyse von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) in Form der Hochdurchsatztypisierung für viele SNPs, sowie anschließend die Sequenzierung auffällig erscheinender Bereiche auf der DNA zur Identifikation des kausalen Gens und schließlich der kausalen Mutation. In der Holsteinzucht ist es – wie auch bei anderen Rindern und überhaupt anderen Nutztieren – übliche Praxis, ab der Verfügbarkeit des Gentests keine Vatertiere mehr einzusetzen, welche als Anlageträger identifiziert worden sind. Das Testen weiblicher Elitetiere (potenzielle Bullenmütter) wird ebenfalls praktiziert, und die erkannten Tiere werden von der Zucht ausgeschlossen.

Hinsichtlich der Bullen, welche allerdings schon vor der Verfügbarkeit eines Gentests einen Zuchtwert bekamen, wird bei herausragenden Bullen meistens ein weiterer Einsatz, d.h. eine weiterlaufende Vermarktung von Sperma, praktiziert. Die Argumentation der Zuchtpraxis ist in diesem Fall, dass auf einen Einsatz eines solchen wertvollen Bullen nicht verzichtet werden kann und mit jedem Spermaverkauf die Empfehlung gegeben wird, keine Anpaarungen an weibliche Tiere mit nunmehr erkannten Anlageträgern vorzunehmen. Diese Argumentation gründet sich auch darauf, dass üblicherweise die Frequenz des Schadallels in der Population als sehr niedrig angenommen werden kann, so dass die erwarteten Frequenzen für homozygot rezessive Individuen sehr gering sind. Durch den Ausschluss des Einsatzes neu erkannter Anlageträger wird mit dieser Praxis auch eine weitere Verbreitung des Schadallels in der Population eingedämmt.

Ziel der vorliegenden Studie war es, für die drei genannten Erbdefekte, zunächst die geschilderte „übliche Praxis“ der Zuchtorganisationen im Umgang mit Erbdefekten exemplarisch für die deutsche Holsteinzucht zu überprüfen. Ein weiteres Ziel bestand darin, die Zuchtwerte für eine Reihe von Merkmalen, von Bullen, welche homozygot für den Wildtyp sind (homozygot gesund), mit den Zuchtwerten für Anlageträger (heterozygot) zu vergleichen, um so eine eventuelle Abweichung von einem für die genannten Erbdefekte angenommenen vollständig dominant/rezessiven Erbgang zu überprüfen.



## 2. Die untersuchten Erbdefekte

Die drei in der vorliegenden Studie im Fokus stehenden Erbdefekte sind in Tabelle 1 in einer Übersicht zusammengefasst. Es handelt sich zunächst um die Bovine Leukozyten-Adhäsionsdefizienz (BLAD), welche durch eine Mutation im Strukturgen des  $\beta 2$ -Integrin-Gens (CD18 Gen) hervorgerufen wird. Durch einen Basenaustausch wird auf der Ebene dieses Leukozytenmembranproteins ein verändertes Protein durch den Austausch von Asparagin zu Glycin gebildet. Der Effekt dieser Veränderung ist ein Verlust der Adhäsionsfähigkeit der Leukozyten und damit als Konsequenz eine Immunschwäche. Die betroffenen Tiere kümmern, leiden an chronischen Infektionen und haben eine deutlich verminderte Lebenserwartung.

Wichtigste Anlageträger der internationalen Holsteinzucht waren Osborndale Ivanhoe, Penstate Ivanhoe Star und insbesondere Carlin-M Ivanhoe Bell sowie A-Puget-Sound Sheik. Die genannten Bullen sind in fast jedem Pedigree eines Holsteinrindes anzutreffen, gaben das Schädallel jedoch natürlich nicht immer weiter. Dies trifft beispielsweise auf den sehr bekannten Enkel von Osborndale Ivanhoe, Round-Oak-Rag-Apple Elevation, zu, welcher als „Stammvater“ aller Holsteins angesehen wird. Osborndale Ivanhoe und Penstate Ivanhoe Star wurden in Deutschland nicht eingesetzt, sondern übten ihren Einfluss vornehmlich über Söhne und Enkel aus. Carlin-M Ivanhoe Bell und A-Puget-Sound Sheik wurden in Deutschland nur begrenzt eingesetzt. Wichtige Anlageträger in Deutschland im Eigentum deutscher Besamungsstationen sind in Tabelle 1 angegeben, wobei dort in der letzten Zeile nur Bullen ab 10000 Töchtern in Deutschland aufgelistet sind.

Tab. 1 Übersicht über die drei in der Studie untersuchten Erbdefekte (monogen, rezessiver Erbgang)

	<b>BLAD</b> <b>Bovine Leukozyten-Adhäsionsdefizienz</b>	<b>CVM</b> <b>Komplexe vertebrale Malformation</b>	<b>BY</b> <b>Brachyspina</b>
Art des Defektes	Immunschwäche	Komplexe Missbildung, meist Aborte	Komplexe Missbildung, meist Aborte
Betroffenes (kausales) Gen	$\beta 2$ -Integrin (CD18)	SLC35A3	FANCI
Publikation	SHUSTER et al. 1992	ACKERMANN et al. 2006	THOMSEN et al. 2012
Gentest in der Praxis verfügbar seit	1994	2002	2011
Wichtige Anlageträger international (Auswahl)	Osborndale Ivanhoe, Penstate Ivanhoe Star, Carlin-M Ivanhoe Bell, A-Puget-Sound Sheik	Carlin-M Ivanhoe Bell, Southwind Bell-of-Bar-Lee, Esquimau Leadman, Calbrett-I H H Champion	Sweet-Haven Tradition, Bis-May Tradition Cleitus, Rothrock Tradition
Wichtige Anlageträger in Deutschland (Auswahl)	Belmont, Cleiber ET Eifer, Shogun	Emil, Soba	Ramos, Cook, Jetlag, Novize

Wiederum Carlin-M Ivanhoe Bell sowie Southwind Bell-of-Bar-Lee und Esquimau waren Anlageträger für den Gendefekt CVM, die komplexe vertebrale Missbildung (*Complex Vertebral Malformation*). Ursache von CVM ist eine *Missense*-Mutation im SLC35A3-Gen, welches für den UDP-N-Acetylglucosamintransporter kodiert. Die Folgen sind meistens mittelfrühe Aborte

und sehr selten auch Geburten toter Kälber, welche „gestaucht“ erscheinen und umfassende Missbildungen des Skeletts, insbesondere der Wirbelsäule, aufweisen. Die drei genannten international wichtigen Bullen wurden in Deutschland nur sehr begrenzt zur Erzeugung von Nachzuchten in Milchviehbetrieben eingesetzt. Schwerpunkt des Einsatzes waren vor Erkennung des Erbdefektes gezielte Paarungen mit potenziellen Bullenmüttern. Lediglich zwei Anlageträger im Besitz deutscher Besamungsstationen erreichten 10000 und mehr Töchter.

Der Erbdefekt Brachyspina (BY) ist der jüngste bekannte identifizierte Erbdefekt mit größerer Bedeutung in der Holsteinzucht. Eine Deletion im FANCI-Gen (*Fanconi Anemia Complementation Group I*) wirkt in der Konsequenz sehr ähnlich wie der Defekt CVM. Umfassende Missbildungen toter Kälber werden selten beobachtet, ein hoher Grad der Nicht-Beobachtung entsteht durch unbemerkte Aborte. Unter den aufgeführten international bedeutsamen Bullen sind mit Rothrock Tradition Leadman und Calbret-I H H Champion in diesem Fall auch zwei Bullen, welche nicht nur vornehmlich als Bullenväter, sondern auch als Kuhväter in Deutschland eingesetzt wurden. Weiter erwies sich der deutsche „Ausnahmebulle“ Ramos letztlich als Träger von Brachyspina, hatte aber inzwischen mehr als 60000 Töchter in Deutschland und zahlreiche Töchter auch in anderen Ländern. Drei weitere Bullen in deutschem Besitz erreichten die Grenze von 10000 Töchtern. Die Streuung des Schadallels für Brachyspina war mithin deutlich stärker als für CVM oder BLAD.

### 3. Material und Methoden

Das der vorliegenden Studie zugrunde liegende Datenmaterial basiert auf den durch die Vereinigten Informationssysteme Tierhaltung w. V. (VIT), Verden/Aller, geschätzten Zuchtwerten für Holsteinbullen, wobei die Auswertung auf schwarzbunte Holsteins beschränkt wurde. Für die Analysen zu BLAD und CVM wurden die Zuchtwerte Stand 12/2012 verwendet, aufgrund der Aktualität des Gendefektes Brachyspina wurden die Auswertungen auch mit dem Stand 08/2013 wiederholt, nur letztere werden für Brachyspina nachfolgend dargestellt. Die Zuchtwerte werden als Datei in Form der sogenannten ZWVITALL-Datei der Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Diese Datei ist für Bullen ab Geburtsjahr 1990 vollständig hinsichtlich aller getesteten Bullen der jeweiligen Jahrgänge und umfasst je Jahrgang ca. 700 bis 1100 Bullen für den Zeitraum 1990 bis 2008. Da im Jahr 2009 die genomische Selektion beim Holsteinrind eingeführt wurde, ist der Jahrgangsumfang ab 2009, bedingt durch die Vorselektion, deutlich geringer. Nur die Brachyspina-Auswertung ist von diesen neuen Entwicklungen betroffen.

Für jeden Bullen wurde sein Status (0 = homozygot Wildtyp; 1 = heterozygoter Anlageträger) aus den in den Dateien vorhandenen Angaben extrahiert und kodiert. Extrahiert wurden weiter alle verzeichneten Zuchtwerte sowie die Töchterzahl in der Zuchtwertschätzung für Milchleistung. Für die Betrachtung der Verteilung der beiden Statusklassen auf die Jahrgänge wurden alle verfügbaren Bullen einbezogen, für die Analysen zum Vergleich der beiden Statusgruppen bezüglich der Zuchtwerte wurden nur Bullen einbezogen, welche im Besitz nord- und ostdeutscher Zuchtorganisationen waren und einen regulären Testeinsatz bzw. einen Einsatz als genomisch vorselektierter Bulle in Deutschland durchlaufen hatten. Somit wurden für die Kontrastschätzung Bullen im ausländischen Besitz und wenige Einzelbullen im Besitz süddeutscher Besamungsstationen ausgeschlossen. Die Kontrastschätzung umfasste hinsichtlich der Zuchtwerte alle Relativzuchtwerte aller Hauptkomplexe (Milch, Exterieur, Nutzungsdauer, Zellzahl, Reproduktion, Kalbeverlauf) sowie für die Komplexe Reproduktion (auch als

„Töchterfruchtbarkeit“ bezeichnet, da ausschließlich die maternale Komponente analysiert wird) und Kalbeverlauf auch die einzelnen Merkmale dieser Komplexe. Insgesamt wurden 13 Merkmale bzw. Zuchtwerte analysiert.

Da sämtliche geschätzte Zuchtwerte bereits eine Korrektur für alle denkbaren und systematisierbaren Einflussgrößen beinhalten und auf eine jeweils einheitliche Basis bezogen sind, kann der Kontrast zwischen den beiden Statusklassen mit einem einfachen, fixen Modell erfolgen, welches als Modell lediglich den Status enthält. Der Test ist damit ein einfacher t-Test.

Die Schätzung der Allelfrequenzen erfolgte nach folgender Formel: Wenn die absoluten Zahlen der Genotypen AA, Aa und aa mit H, Q und M bezeichnet werden, errechnen sich die Allelfrequenzen p und q üblicherweise nach

$$P(A) = p = (2H + Q) / 2 (H + Q + M) \text{ und } q = 1 - p. \quad [1]$$

Wenn allerdings die Genotypen M vollständig fehlen, kann unter der Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes die obige Formel wie folgt umgestellt werden:

$$P(A) = p = 2H / (2H + Q) \text{ und } q = 1 - p. \quad [2]$$

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Verteilung der Beobachtungen auf Statusgruppen

Tabelle 2 gibt einen Überblick zum verwendeten Datenmaterial und insbesondere zur Verteilung auf die beiden Statusgruppen. Für jeden Erbdefekt ergibt sich eine unterschiedliche Zeitperiode, welche für eine Auswertung infrage kommt. Dies ist jeweils die Periode, welche unmittelbar vor der Verfügbarkeit eines Gentests lag. Für alle drei Gendefekte gilt, dass nach der Verfügbarkeit eines Gentests fast keine Bullen mehr auftauchen, welche als Anlageträger erkannt wurden. Einzelne wenige Bullen mit Geburtsjahren nach der Verfügbarkeit des Gentests gibt es jedoch. Diese sind vornehmlich das Resultat von ursprünglichen Fehltypisierungen, welche später wiederholt wurden. Insgesamt kann man den Zuchtorganisationen der deutschen Holsteinzucht jedoch attestieren, dass recht verantwortungsvoll mit Erbdefekten umgegangen wird, da nach der Verfügbarkeit des Gentests kaum mehr Anlageträger in Erscheinung treten und somit vor einem Zuchteinsatz bereits ausgeschlossen wurden.

Für jeden der drei Gendefekte ist eine Zeitperiode von sechs bis sieben Jahren angegeben, welche sich überhaupt für eine Auswertung beim Vergleich der beiden Statusgruppen eignet. Die Länge der Periode ergibt sich dabei daraus, dass zum Zeitpunkt der Verfügbarkeit des Gentests alle aktuellen Jahrgänge, insbesondere die aktuell vermarkteten Kuhväter und die Jahrgänge der Wartebullen bis zurück zum jüngsten Testbullenjahrgang bzw. zum Jahrgang der zur Selektion anstehenden Bullenkälber getestet wurden. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass die Tests auf Freiwilligkeit der Zuchtorganisationen beruhen, mithin kaum den vollständigen Jahrgang umfassen, andererseits aber mutmaßlich gerade alle Bullen, welche einen Verdachtsmoment aufgrund ihres Pedigrees begründen. Die beiden vorgenannten Aussagen gelten für die Erbdefekte BLAD und CVM. Für diese beiden ergibt sich also teils eine Verzerrung durch nicht vollständiges Testen und teils eine Verzerrung durch gerade selektives Testen bei Verdacht aufgrund des Pedigrees. Hinsichtlich CVM ist eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen von KONERSMANN et al. (2003) festzustellen, welche die Frequenz der Anlageträger für die Geburtsjahre 1997 bis

Tab. 2 Übersicht über das Datenmaterial. Anzahl Bullen mit Wildtyp (Status = 0) und Anlageträger (heterozygot für die Mutation) nach Jahrgängen für die Erbdefekte BLAD, CVM und Brachyspina

Jahrgang	Status = 0	Status = 1	Gesamt
<b>BLAD</b>			
1985	38	8	46
1986	92	7	99
1987	132	18	150
1988	170	38	208
1989	253	56	309
1990	432	34	466
1991	495	12	507
Total	1612	173	1785
<b>CVM</b>			
1995	61	11	72
1996	117	36	153
1997	349	75	424
1998	436	55	491
1999	361	115	476
2000	533	105	638
Total	1857	397	2254
<b>Brachyspina</b>			
2007	180	26	206
2008	276	23	299
2009	210	10	220
2010	366	20	386
2011	404	8	412
2012	229	1	230
Total	1665	88	1753

2000 mit 13,2% beziffern; für denselben Zeitraum ergibt sich aus Tabelle 2 eine Frequenz von 17,2%, wobei zu berücksichtigen ist, dass in der Studie von KONERSMANN et al. (2003) lediglich vier der hier verwendeten 13 Besitzerorganisationen berücksichtigt wurden. Für BLAD ist anzumerken, dass die ZWVITALL-Datei bezüglich der sehr alten Jahrgänge nicht ganz vollständig ist, allerdings schwerpunktmäßig die Bullen erfasst, welche in den Wiedereinsatz gelangten.

Schließlich ist für Brachyspina festzuhalten, dass mittlerweile die Genotypisierungen ein Nebenprodukt der genomischen Selektion geworden sind, so dass von einer höheren Testquote in den Jahrgängen ab 2009 ausgegangen werden kann. Die Ableitung des wahrscheinlichen Genotyps für Brachyspina (und andere Erbdefekte) kann als Nebenprodukt der genomischen Selektion mit hoher Sicherheit erfolgen, ohne direkt für die kausale Mutation überhaupt zu genotypisieren, da aufgrund des hohen Kopplungsungleichgewichtes bei der Rasse Holstein selbst weiter entfernt vom Gen liegende SNPs ein aussagefähiges Ergebnis erbringen. Diese Art des indirekten Testens wurde bereits von COLE et al. (2009) für die kausalen Gene von BLAD und CVM sowie für einige andere Gene untersucht und als aussichtsreich befunden.

#### 4.2 Vergleich der Statusgruppen Gesund – Anlageträger

Für den Vergleich der beiden Statusgruppen für BLAD (jeweils Status = 0 – Status = 1) ergaben sich bei den untersuchten Zuchtwerten lediglich zwei Signifikanzen für die Merkmale RZE (Relativzuchtwert Exterieur, Differenz 2,4 Punkte, P-Wert = 0,004) und RZS (Relativzuchtwert Zellzahl, Differenz 4,2 Punkte, P-Wert = < 0,0001). Die Signifikanz für RZE ist vermutlich als Zufallsbefund anzusehen, welcher durch die Stratifikation der Bullen bedingt ist; BLAD-Träger entstammten exterieurstarken Familien. Die wesentlich deutlichere Signifikanz bezüglich des Zuchtwertes für die Zellzahl, gerichtet in der Weise, dass homozygot gesunde Bullen den höheren Wert aufweisen („mehr Resistenz vererben“), könnte als Hinweis für entweder eine nur unvollständig dominante Vererbung des kausalen Gens oder als Hinweis darauf, dass unter Umständen wenige immunschwache Töchter doch das Lebensalter einer Kuh mit zumindest einer Abkalbung erreichen, gewertet werden. Ein Effekt des BLAD-Status auf die Eutergesundheit war nur selten Thema in der Literatur. Zwei Autorengruppen (WANNER et al. 1998, BOICHARD et al. 2003) postulierten einen Effekt in der Eutergesundheit, fanden aber keine Belege dafür (RUPP und BOICHARD 2003). KELM et al. (1997) berichteten, dass für BLAD zwar keine Signifikanz bezüglich der Zellzahl, wohl aber ein signifikantes Ergebnis für den Befund klinischer Mastitis auftrat – letzteres allerdings in umgekehrter Richtung, das Schädallel für BLAD schien einen senkenden Einfluss auf das Vorhandensein klinischer Mastitis zu haben. Die vorliegende Studie scheint mithin einzig das „erwartete“ Ergebnis zu erbringen, aufgrund des immer noch vergleichsweise geringen Datenmaterials und der vorhandenen Unvollständigkeit der Genotypisierung ist aber immer letztlich nur ein vorsichtiger Hinweis gegeben.

Die Ergebnisse der Kontrastschätzung für den Erbdefekt CVM sind in Tabelle 3 dargestellt. Zunächst ist anzumerken, dass ein Vergleich von homozygot gesunden Bullen mit den Anlageträgern eigentlich vordringlich für den paternalen Befruchtungserfolg, also das Vermögen des Bullen, eine Trächtigkeit herbeizuführen, sowie für die direkte Totgeburtenrate, also die Betrachtung des Vaters des Kalbes, anzustellen ist. Dies entspräche damit der Vorgehensweise von KÖNIG und SIMIANER (2006), welche für beide Merkmale Unterschiede in den Zuchtwerten in der Größenordnung von 2,1 bis 4,7 Punkten zugunsten der homozygot gesunden Bullen finden. Zuchtwerte für die männliche Fruchtbarkeit werden allerdings aufgrund der extrem niedrigen Erblichkeit und insbesondere auch aufgrund der hohen Abhängigkeit von periodischen Zeiteinflüssen nicht mehr publiziert. Die männliche Fruchtbarkeit war somit nicht Gegenstand der Untersuchungen. Neben zwei Signifikanzen für die Merkmale Relativzuchtwert Milch und Relativzuchtwert Nutzungsdauer, welche wiederum ein Produkt der Stratifikation des Datenmaterials sein dürften, da durch ihre Komplexität kaum ein direkter biologischer Zusammenhang mit dem CVM-verursachenden Gen gegeben sein dürfte, finden sich drei signifikante Kontraste für die weibliche Fruchtbarkeit. Neben dem zusammengefassten „Obermerkmal“ Relativzuchtwert Reproduktion (Töchterfruchtbarkeit) finden sich zwei Einzelmerkmale, welche direkt den Akt der Konzeption betreffen, die *Non-Return-Rate* für Kühe (RZW\_nrc) und das mit ihr autokorrelierte Merkmal „Konzeption“ (RZW\_kon), errechnet aus den *Non-Return-Raten* und Verzögerungszeiten bei Kühen und juvenilen Rindern. In allen drei Fällen ergibt die Kontrastschätzung Vorteile für die homozygot gesunden Bullen, obschon im Vergleich zur Schätzung eines direkten Effektes ja die Töchterfruchtbarkeit betrachtet wird, also nur die Hälfte des eigentlichen Effektes geschätzt werden kann, da ein homozygot gesunder Bulle eben homozygot gesunde Töchter wie auch Anlageträger haben kann, bei denen das Schädallel von der Mutterseite gekommen ist. Analoges

gilt für einen Bullen als Anlageträger. Weder direkte noch maternale Kalbmerkmale ergaben signifikante Kontraste. Für CVM kann dies aufgrund der Natur des Defektes auch kaum erwartet werden.

Tab. 3 Kontrastschätzung für die Differenz der geschätzten Zuchtwerte nach Status der Bullen (Wildtyp: Status = 0 und Anlageträger, heterozygot für die Mutation: Status = 1) für CVM

	CVM Status		Differenz $\Delta$	Signifikanz P-value
	0	1		
RZM	96,2	99,2	-3,0	,0001
RZN	97,9	95,0	+2,9	,0001
RZR	100,8	99,2	+1,6	,0021
RZW_nrc	99,7	98,4	+1,3	,0260
RZW_kon	99,6	98,4	+1,2	,0067

RZM = Relativzuchtwert Milchleistung, RZN = Relativzuchtwert Nutzungsdauer, RZR = Relativzuchtwert Reproduktion (Töchterfruchtbarkeit), RZW\_nrc = Relativzuchtwert *Non-Return-Rate* (Kühe), RZW\_kon = Relativzuchtwert Konzeption

Die Liste der signifikanten Kontraste hinsichtlich des Erbdefektes Brachyspina ist mit 11 Merkmalen bzw. Zuchtwerten besonders lang (Tab. 4). Lediglich für die Zellzahl (RZS) und die Rastzeit der Kühe (RZW\_cfc) ergeben sich keine Signifikanzen. Diese sind aufgrund der Natur des Defektes und der Definition der beiden genannten Merkmale auch nicht zu erwarten.

Tab. 4 Kontrastschätzung für die Differenz der geschätzten Zuchtwerte nach Status der Bullen (Wildtyp: Status = 0 und Anlageträger, heterozygot für die Mutation: Status = 1) für Brachyspina

	BY Status		Differenz $\Delta$	Signifikanz P-value
	0	1		
RZG	129,3	121,1	8,2	<0,0001
RZM	119,3	114,2	5,1	<0,0001
RZE	117,5	114,7	2,8	0,0057
RZN	116,5	112,5	4,0	<0,0001
RZR	105,3	99,4	5,9	<0,0001
RZW_nrc	102,0	95,2	6,8	<0,0001
RZW_kon	104,7	98,8	5,9	<0,0001
RZW_nrh	104,5	101,1	3,4	0,0002
RZW_flh	103,6	100,9	2,7	<0,0001
dRZK	104,1	99,6	4,5	<0,0001
mRZK	103,9	100,1	3,8	<0,0001

RZG = Relativzuchtwert Gesamt, RZM = Relativzuchtwert Milchleistung, RZE = Relativzuchtwert Exterieur, RZN = Relativzuchtwert Nutzungsdauer, RZR = Relativzuchtwert Reproduktion (Töchterfruchtbarkeit), RZW\_nrc = Relativzuchtwert *Non-Return-Rate* (Kühe), RZW\_kon = Relativzuchtwert Konzeption, RZW\_nrh = Relativzuchtwert *Non-Return-Rate* (Färsen), RZW\_flh = Relativzuchtwert Intervall erste bis erfolgreiche Besamung (Färsen), dRZK = Relativzuchtwert Kalbmerkmale (direkter Effekt), mRZK = Relativzuchtwert Kalbmerkmale (maternaler Effekt)

Signifikante Kontraste ergeben sich zunächst wiederum für die Hauptkomplexe ‚Gesamt‘, ‚Milch‘, ‚Exterieur‘ und ‚Nutzungsdauer‘. Nur für das letztgenannte Merkmal ließe sich ein direkter Bezug zum Gendefekt unter der Annahme einer nicht-vollständigen Dominanz im Erbgang für BY herstellen, für die drei erstgenannten Merkmale sind vermutlich wiederum Stratifikationseinflüsse sowie die Tatsache, dass im Relativzuchtwert ‚Gesamt‘ alle Einzelmerkmale vereinigt sind, verantwortlich. Sehr hohe Differenzen ergeben sich für die Konzeptionsleistung, insbesondere festgestellt bei den Kühen, aber mit geringeren Differenzen bei identischem Signifikanzniveau auch bei juvenilen Rindern (Färsen). Bei deutschen Holsteins werden die geschätzten Zuchtwerte auf einen Mittelwert von 100 und eine Standardabweichung der wahren Zuchtwerte von 12 Punkten standardisiert. Für niedrig erbliche funktionale Merkmale ergeben sich allerdings etwas niedrigere Standardabweichungen von 9 bis 10 Punkten auf der Ebene der tatsächlich geschätzten Zuchtwerte. Somit entsprechen die Kontraste für die Zuchtwerte bzw. Merkmale RZR, RZW\_nrc und RZW\_kon, welche im Abschnitt zu CVM bereits erläutert wurden, einer Größenordnung von mehr als der Hälfte der Standardabweichung der Bullenzuchtwerte und mithin einer Größenordnung auf der Kuhebene von ca. einer genetischen Standardabweichung. Derartig ausgeprägte Kontraste können kaum zufälliger Natur sein.

#### *4.3 Schätzung der Allelfrequenzen*

Wie im Abschnitt Material und Methoden erläutert, kann eine Schätzung der Allelfrequenzen, da die homozygot rezessiven Genotypen fehlen, nicht nach der üblichen Formel erfolgen. Vielmehr muss hilfswise auf eine andere Formel zurückgegriffen werden, für deren Gültigkeit aber eigentlich die Annahme eines Gleichgewichtes nach HARDY und WEINBERG Voraussetzung ist. Genau dieses Gleichgewicht kann für einen Erbdefekt mit dominant/rezessivem Erbgang aber nur schwer angenommen werden.

Für die Frequenz des Schadallels von CVM und die einbezogenen Jahrgänge 1995 bis 2000 ergibt sich eine Frequenz des Defektallels von 9,7 %. Für Brachyspina beträgt die Frequenz des Schadallels 2,6 %. Die beiden Werte legen zunächst nahe, dass CVM das deutlich bedeutendere Problem in der deutschen Holsteinzucht ist bzw. war. Es ist aber zu berücksichtigen, dass die Mutante des CVM-verursachenden Gens erst relativ spät gefunden wurde und mithin eine beträchtliche Zeit verstrich, in der immer mehr Bullen, welche Nachkommen der heute bekannten Anlageträger waren, zur Zucht erwählt wurden. Eigentlich waren die Bullen der Bell-Linie in Deutschland gar nicht sehr gefragt, durch den Zeitverzug wurde trotzdem eine vergleichsweise hohe Streuung erreicht. Umgekehrt verhält es sich mit dem Erbdefekt Brachyspina. Die kausale Ursache wurde relativ schnell geklärt, viele in Deutschland häufig eingesetzte Bullen und insbesondere auch der deutsche Ausnahmestier Ramos waren zwar betroffen, betroffene Nachkommen wurden allerdings schnell von der Zucht ausgeschlossen. Es ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass keine Daten verfügbar sind, welche die Schätzung der Frequenzen der Anlageträger unter allen potenziell selektierten Bullenkälbern erlauben würden. Noch wichtiger wäre aber eine Schätzung der Allelfrequenzen in der Kuhpopulation.

#### *4.4 Die Ergebnisse der Kontrastschätzung im Kontext der Allelfrequenzen*

Wie oben erläutert, ergeben sich für die Schätzung der Kontraste zwischen homozygot gesunden Bullen und Anlageträgern erhebliche Werte gerade für die Merkmale der Konzeption der Töchter.



ter. Vordergründig könnte man diese damit erklären, dass bei der Anpaarung mit Anlageträgern unter den Töchtern mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % Anlageträger entstehen (Abb. 1).

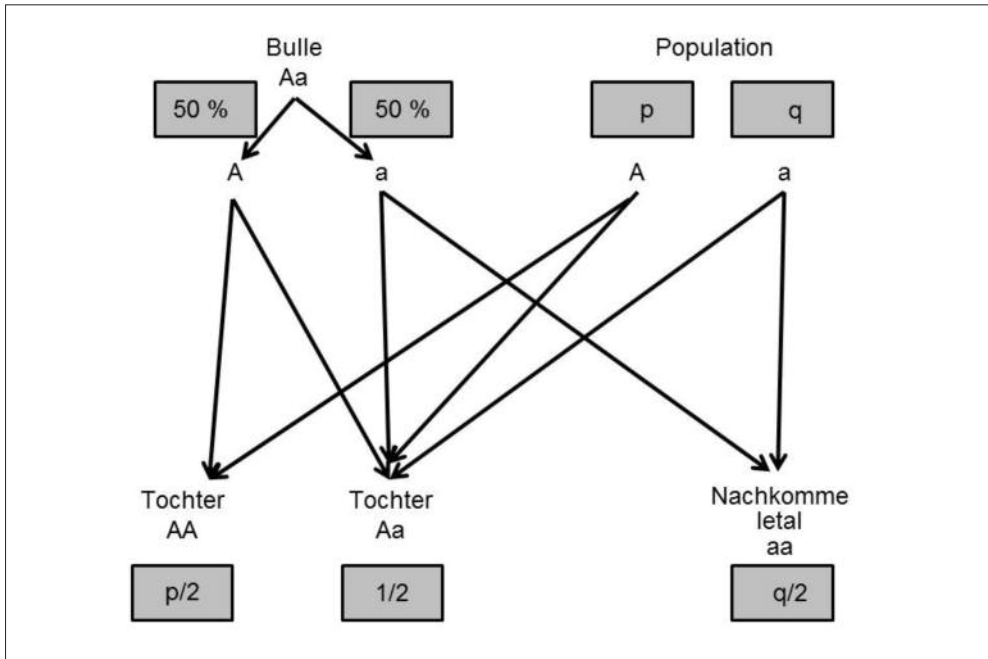


Abb. 1 Erwartete Genotypfrequenzen bei der Anpaarung mit einem Anlageträger in Abhängigkeit von der Frequenz des Wildtyp-Allels (p) und des mutierten Allels (q)

Die Wahrscheinlichkeit für einen homozygot betroffenen Genotyp beträgt  $q/2$ , im Fall von *Brachyspina*, unter der Annahme, die Frequenz des Schadallels sei wie in der Bullenpopulation, also 1,3%. Diese Genotypen nehmen aber am weiteren Zuchtgeschehen nicht mehr teil. Die Zuchtwertschätzung der Töchter des Bullen für die Töchterfruchtbarkeit kann nur durch die 50% seiner Töchter, welche heterozygote Töchter sind, beeinflusst sein. Unter diesen, bei Anpaarung an einen zufälligen Bullen, welcher selbst mit einer Wahrscheinlichkeit von  $2pq$  Anlageträger ist, beträgt die Wahrscheinlichkeit für einen letalen Genotyp  $\frac{1}{4} (2pq)$ , und die Wahrscheinlichkeit für Anlageträger unter den Nachkommen ist  $\frac{1}{2} (2pq)$ . Die Wahrscheinlichkeit, dass homozygot betroffene Nachkommen entstehen, die sich als (frühe) Aborte manifestieren und oft sogar unentdeckt bleiben, ist also sehr klein. Für die betroffenen Anpaarungen ist eine verminderte Konzeptionsleistung zu beobachten, mehr Besamungen sind für die nächste Trächtigkeit nötig. Der seltene Fall eines homozygot betroffenen Nachkommen dürfte aber kaum ausreichen, die Schätzung der Zuchtwerte eines Bullen für die Fruchtbarkeit seiner Töchter in derartigen Größenordnungen zu beeinflussen, wie es nach den Ergebnissen aus Tabelle 4 offenbar wird. Eher ist ein Effekt der verminderten Fruchtbarkeit bei den Töchtern zu vermuten, welche Anlageträger sind.

Für eine genauere Berechnung hinsichtlich des Effektes der homozygot betroffenen Nachkommen der Töchter müssten Annahmen getroffen werden, welche die konkreten Auswirkungen eines Abortes auf die Fruchtbarkeitskennzahlen (Verzögerungszeit, *Non-Return-Rate*) einer Kuh

beinhalten würden. Da in der vorliegenden Betrachtung ohnehin schon Annahmen zu den Allelfrequenzen enthalten sind, würde eine derartige Berechnung auf einer Kette von Annahmen beruhen, so dass dieser Weg hier nicht beschritten werden soll. Als Ergebnis sollte aber festgehalten werden, dass die Anpaarung mit Anlageträgern zumindest im Fall von Brachyspina auch Konsequenzen in einer verminderten Fruchtbarkeit heterozygoter Töchter zu haben scheint.

## **5. Schlussfolgerungen**

Der Umgang der deutschen Holsteinzucht mit auftretenden Erbdefekten kann exemplarisch für die drei Defekte BLAD, CVM und Brachyspina als verantwortungsbewusst bezeichnet werden. Nach Verfügbarkeit eines Gentests finden sich in späteren Geburtsjahrgängen nur extrem wenige bzw. keine Bullen mehr, welche als Testbullen in den Einsatz gekommen sind. Durch den mehr oder weniger starken Einsatz von Anlageträgern vor der Verfügbarkeit des jeweiligen Gentests bzw. auch durch den Einsatz von Anlageträgern, welche sich zum Zeitpunkt der Verfügbarkeit des Gentests schon als überragende Wiedereinsatzbullen qualifiziert hatten und deshalb nicht von der Zucht ausgeschlossen wurden, sind die Schadallele für die drei genannten Defekte aber dennoch in der Population verbreitet worden. Die hierdurch vorhandenen Anlageträger treffen in den Verpaarungen aber nicht auf neue Anlageträger in späteren Generationen, so dass die weitere Entstehung von homozygot betroffenen Individuen verhindert worden ist bzw. wird.

Das Ausmaß der Verbreitung von Schadallelen kann hinsichtlich der Kuhpopulation kaum quantifiziert werden. Nur durch die Schätzung der Allelfrequenz in der Kuhpopulation könnte das Ausmaß des Schadens, welchen Schadallele anrichten, tatsächlich abgeschätzt werden. Hilfsweise wird herkömmlich angenommen, dass für die Kuhpopulation ähnliche Frequenzen gelten wie für die Bullenpopulation. Dies muss aber, gerade bei selektiver Testung in der Bullenpopulation, nicht immer richtig sein. Schätzungen der Allelfrequenz für Schadallele in der Kuhpopulation sind derzeit noch mit großen Unsicherheiten behaftet. Dies dürfte sich aber in Kürze ändern, wenn mit jetzt sinkenden Kosten in großem Umfang auch weibliche Tiere mithilfe hochdichter SNP-Arrays genotypisiert werden.

Derartige Daten erlauben dann nicht nur exakte Allelfrequenzschätzungen, sondern auch Analysen zur Leistung und Gesundheit heterozygoter Individuen. Vermehrt werden in der deutschen Holsteinzucht sogenannte Testherden etabliert, in denen eine umfangreiche Phänotypisierung und auch Genotypisierung vorgenommen wird. Derartige Herden eignen sich in idealer Weise auch zur Aufdeckung von Erbdefekten und für die Entwicklung von Bekämpfungsstrategien.

Bezüglich des erst kürzlich aufgetretenen Erbdefektes Brachyspina ergeben sich Hinweise, dass auch heterozygote Töchter (Anlageträger) von Vätern, welche Anlageträger sind, offensichtlich eine verminderte Konzeptionsleistung zeigen. Diesem Phänomen sollte durch weitere Untersuchungen nachgegangen werden.

## *Literatur*

- BOICHARD, D., GROHS, C., BOURGEOIS, F., CERQUEIRA, F., FAUGERAS, R., NEAU, A., RUPP, R., AMIGUES, Y., BOSCHER, M. Y., and LEVEZIEL, H.: Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 35, 1–25 (2003)

- CHARLIER, C., AGERHOLM, J. S., COPPIETERS, W., KARLSKOV-MORTENSEN, P., LI, W., JONG, G. DE, FASQUELLE, C., KARIM, L., CIRERA, S., CAMBISANO, N., AHARIZ, N., MULLAART, E., GEORGES, M., and FREDHOLM, M.: A deletion in the bovine FANCI gene compromises fertility by causing fetal death and Brachyspina. *PLoS One* 7/8, e43085 (2012)
- COLE, J. B., VANRADEN, P. M., O'CONNELL, J. R., VAN TASSELL, C. P., SONSTEGARD, T. S., SCHNABEL, R. D., TAYLOR, J. F., and WIGGANS, G. R.: Distribution and location of genetic effects for dairy traits. *J. Dairy Sci.* 92, 2931–2946 (2009)
- KELM, S. C., DETILLEUX, J. C., FREEMAN, A. E., KEHRLI, M. E., DIETZ, A. B., FOX, L. K., BUTLER, J. E., KASCKOVICS, I., and KELLEY, D. H.: Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 80, 1767–1777 (1997)
- KÖNIG, S., and SIMIANER, H.: Approaches to the management of inbreeding and relationship in the German Holstein dairy cattle population. *Livest. Sci.* 103, 40–52 (2006)
- KONNERSMANN, Y., WEMHEUER, W., und BREINIG, B.: Herkunft, Verbreitung und Bedeutung des CVM-Gendefekts in der Holstein-Friesian-Population. *Züchtungskunde* 75, 9–15 (2003)
- RUPP, R., and BOICHARD, D.: Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.* 34, 671–688 (2003)
- 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 (1994)
- 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)
- WANNER, J. M., ROGERS, G. W., KEHRLI, M. E., and COOPER, J. B.: Intramammary infections in primiparous Holsteins: Heritabilities and comparisons of bovine leukocyte adhesion deficiency carriers and noncarriers. *J. Dairy Sci.* 81, 3293–3299 (1998)

Prof. Dr. Hermann H. SWALVE  
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Theodor-Lieser-Straße 11  
06120 Halle/Saale  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 345 5522320 / 5522321  
Fax: +49 345 5527105  
E-Mail: hermann.swalve@landw.uni-halle.de

## **Wie soll die Zucht mit Erbfehlern umgehen? Konzepte und Perspektiven (Zusammenfassung)**

Georg THALLER (Kiel)

Erbfehler treten bei allen Tierarten und Rassen auf und können als immanente Gegebenheit in Zuchtpopulationen betrachtet werden. Eine systematische Erforschung der Erbfehler *per se*, insbesondere deren genetischer Hintergrund, sowie eine diesbezügliche Bewertung der Population gestalteten sich in der Vergangenheit relativ schwierig. Hinweise auf Trägartiere ergaben sich nur über die Beobachtungen von betroffenen Nachkommen, wobei diese nicht systematisch in der Population erfasst und diagnostiziert wurden. Da einzelne Erbfehler in der Regel relativ selten vorkommen, sind selbst die aus der Nachkommenprüfung beim Rind vorliegenden Stichproben für flächendeckendes Screening von Erbfehlern ungeeignet. Geringe Inzidenzen bewirken zudem, dass Erbfehler, die sich z. B. auf die Fruchtbarkeit oder das Kalbeverhalten auswirken, kaum über Zuchtwertunterschiede von Trägartieren identifiziert werden können.

Bedeutende Erbfehler in der Rinderzucht wie die Bovine Leukozyten-Adhäsionsdefizienz (BLAD), die Komplexe Vertebrale Malformation (CVM) oder die Spinnengliedrigkeit konnten über Pedigreeanalysen auf Mutationen in wichtigen Leistungsvererbern zurückgeführt werden. Allerdings ist es im Umkehrschluss nicht zulässig, daraus unmittelbar die Zucht auf hohe Leistung für die Erbfehlerproblematik verantwortlich zu machen. Die rapide fortschreitende Entwicklung in der Molekulargenetik ermöglicht die umfassende Aufklärung vieler Prädispositionen und Erbfehler, und die Zucht ist gefordert, neue Konzepte für den Umgang damit in Populationen zu entwickeln.

Es ist davon auszugehen, dass kaum vollkommen erbfehlerfreie Zuchttiere existieren und ein Ausschluss von Trägartieren aus der Zucht nicht in allen Fällen möglich und sinnvoll ist. Am Beispiel von Scrapie beim Schaf zeigte sich, dass der anfällige Haplotyp in einzelnen Rassen eine hohe Häufigkeit aufwies und die geforderte Keulung dieser Tiere die Populationen in ihrem Bestand stark gefährdet hätten. Es gilt daher zuallererst, sich einen Überblick über die Frequenzen der Defektallele und deren Auswirkungen auf alle relevanten Merkmale zu verschaffen. Die Methode des Imputings erlaubt es im Zeitalter der genomischen Selektion, ausgehend von bekannten Träger- und betroffenen Tieren, den Genotypstatus der gesamten männlichen und zunehmend auch der weiblichen Population individuell zu bestimmen. Mit diesem Wissen können auch die Konsequenzen auf die Zuchtwerte aller relevanten Merkmale belastbar untersucht werden. In aktuellen Beispielen wurde gefunden, dass dies über Populationen hinweg differenziert zu betrachten ist.

Neue Ansätze zum Umgang mit den Erbfehlern sollten auf verschiedenen Stufen entwickelt und in der Praxis implementiert werden. Auf der Ebene des Einzeltiers könnte eine Gesamtbewertung der Beeinträchtigung über einen Erbfehlerindex erfolgen. In diesen sollten der re-

lative ökonomische Schaden und die gegenwärtige Wahrscheinlichkeit des Auftretens betroffener Nachkommen einfließen. Im Weiteren sollten die bereits in der Planung befindlichen genomischen Anpaarungsprogramme um bekannte Erbfehler erweitert werden. So könnte sichergestellt werden, dass keine Tiere, die jeweils am gleichen Erbfehler heterozygot sind, miteinander verpaart werden. Auf Populationsebene ist ein kontinuierliches Monitoring der Erbfehler anzustreben, und mit Hilfe eines optimierten Einsatzes von Zuchttieren sollte eine noch zu tolerierende Allelfrequenz sichergestellt werden. Die zukünftige Nutzung von gesextem Sperma würde die Optionen der Selektion auf der weiblichen Seite deutlich verbessern.

Prof. Dr. Georg THALLER  
Institut für Tierzucht und Tierhaltung  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
24098 Kiel  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 431 8807329  
Fax: +49 431 8802588  
E-Mail: [gthaller@tierzucht.uni-kiel.de](mailto:gthaller@tierzucht.uni-kiel.de)

**Aufklärung erblicher Merkmale beim Pferd:  
Auch monogen vererbte Merkmale können sich  
als schwierig herausstellen!**  
(Zusammenfassung)

Tosso LEEB ML (Bern, Schweiz)

Die Aufklärung monogen vererbter Merkmale bei Haustieren hat sich mit der Einführung von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) und der Möglichkeit zur schnellen Re-Sequenzierung ganzer Genome in den letzten Jahren stark vereinfacht. Dennoch gibt es auch heute noch Erbfehler, deren Aufklärung uns vor große Herausforderungen stellt. Beim Freiburger Pferd kommt die erbliche Leberfibrose (CLF) vor, die aufgrund der völligen Zerstörung der Leber bei betroffenen Fohlen im Alter von 2 bis 12 Monaten zum Tod führt. CLF wird monogen autosomal rezessiv vererbt, und wir konnten die ursächliche Mutation auf ein ca. 2 Mb großes Intervall kartieren, in dem sich auch ein gutes funktionelles Kandidatengen befindet. Wir konnten allerdings bis heute keine nicht-synonyme Mutation in diesem Gen finden, welche CLF erklären könnte. Wir folgern daraus, dass CLF entweder durch eine regulatorische Mutation oder durch eine Mutation in einem bisher unbekanntem Exon verursacht wird. Im Vortrag wurden Lösungsansätze für dieses Projekt diskutiert und die Strategie des Zuchtverbands zur Eradikation des Defekts vorgestellt.

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

## **Nachhaltigkeit in der Wissenschaft**

Leopoldina-Workshop  
am 12. November 2012 in Berlin

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 117, Nr. 398  
Herausgegeben von Jörg HACKER (Halle/Saale, Berlin)  
(2013, 128 Seiten, 20 Abbildungen, 1 Tabelle, 21,95 Euro,  
ISBN: 978-3-8047-3188-2)

Im Mittelpunkt der weltweiten Überlegungen zur Bewältigung zentraler Herausforderungen des 21. Jahrhunderts steht das Konzept der Nachhaltigkeit. Damit dieses Prinzip sich in konkreten Handlungsvorschlägen widerspiegeln kann, bedarf es der Präzisierung. Der Band untersucht daher die Nachhaltigkeit in der Wissenschaft, der wichtigsten Informationsquelle der Gesellschaft. Dabei wird Nachhaltigkeit sowohl der Strukturen als auch der Aktivitäten in Forschung und Lehre betrachtet. Behandelt werden die „Erforschung von Nachhaltigkeit“, die Strategien zum besseren Verständnis liefern soll, der Komplex „nachhaltig forschen“, der Voraussetzungen, Verläufe und Folgen von Forschung gemäß den Kriterien der Nachhaltigkeit analysiert, und die „Nachhaltigkeit von Forschung“, die Wesensprinzipien der Wissenschaft – etwa die Falsifizierbarkeit ihrer Resultate – im Lichte der Idee der Nachhaltigkeit untersucht. Schwerpunkte der Analyse bilden in allen Bereichen einerseits das Spannungsverhältnis zwischen Freiheit und Nachhaltigkeit der Wissenschaft sowie andererseits die Auswirkungen der Debatte auf die Strukturen des Wissenschaftssystems.



## **Rasches Auffinden von kausalen Mutationen bei rezessiven Erbfehlern durch Homozygotie- Kartierung und Sequenzierung** (Zusammenfassung)

Johann SÖLKNER,<sup>1</sup> Cord DRÖGEMÜLLER,<sup>2</sup> Simone MÜLLER,<sup>3</sup>  
Mathias MÜLLER ML,<sup>3</sup> Birgit GREDLER<sup>4</sup> und Tosso LEEB ML<sup>2</sup>

Durch künstliche Besamung und die extreme Nutzung des Spermas von Top-Bullen hat sich die Rate von rezessiven Erbfehlern, die oft zu Totgeburten oder verkrüppelten Kälbern führen, in den letzten Jahrzehnten beim Rind dramatisch erhöht. Manche Ahnen kommen vielfach in den Pedigrees einzelner Tiere vor, und die Wahrscheinlichkeit, dass die von einem wichtigen Ahnen weitergegebene rezessive Mutation an ein Individuum väterlicherseits und mütterlicherseits vererbt wird, ist relativ hoch.

Wegen der beschränkten Anzahl von Rekombinationen und der damit bei der Meiose intakt weitergegebenen großen Stücke elterlicher Chromosomen ist es relativ einfach, bei von Erbfehlern behafteten Fällen überlappende homozygote Segmente (*Runs of Homozygosity*) aufzufinden. Es ist sehr wahrscheinlich, durch Sequenzierung des involvierten Chromosomensgments die kausale Mutation aufzufinden.

Hier wird der Fall des Demetz-Syndroms beim Tiroler Grauvieh beschrieben, einer neuronalen Erkrankung im frühen Jugendstadium. Nach SNP-Chip-Genotypisierung von 15 Fällen, 15 Eltern anderer Fälle und 8 unverwandten Tieren wurde ein 1,9 Mb langes Segment auf Chromosom 16 gefunden, das bei allen Fällen homozygot war. Sequenzierung der Kandidatengene in dieser Region führte zur Auffindung einer Mutation in MFN2, dem Gen, das beim Menschen für Morbus Charcot-Marie-Tooth verantwortlich ist. Die Einzelbasenmutation im kodierenden Bereich des Gens ist ungewöhnlich, weil sie nicht zur Änderung der Aminosäuresequenz führt (synonyme Mutation), aber gleichzeitig eine regulatorische Funktion hat.

Der Weg vom Entschluss zur Suche nach der den Erbfehler verursachenden Mutation bis zum Vorliegen eines funktionierenden Marker-Tests war mit 6 Monaten extrem kurz und erlaubte den Verantwortlichen der Rasse Tiroler Grauvieh eine sehr rasche Änderung der Zuchtstrategie.

Univ.-Prof. Dr. Dipl.-Ing. Johann SÖLKNER  
Universität für Bodenkultur Wien  
Institut für Nutztierwissenschaften (NUWI)  
Augasse 2–6  
1090 Wien  
Österreich

Tel.: +43 1 476543271  
E-Mail: johann.soelkner@boku.ac.at

---

1 Universität für Bodenkultur Wien, Institut für Nutztierwissenschaften (NUWI).

2 Universität Bern, Institut für Genetik.

3 Veterinärmedizinische Universität Wien, Abteilung für molekulare Genetik, Institut für Tierzucht und Genetik.

4 Qualitas AG, Zug.

## **Rolle der Wissenschaft im Globalen Wandel**

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

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

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

## **IV. Modelle für die medizinische Forschung**



## Phänotyp-basierte Erstellung von Krankheitsmodellen in chemisch induzierten Mausmutanten

Bernhard AIGNER (München)

Mit 2 Abbildungen und 2 Tabellen

### *Zusammenfassung*

Eine mögliche Strategie zur Erstellung neuer Mausmodelle für die biomedizinische Forschung besteht in der zufälligen Mutagenese einer großen Anzahl von Tieren und der nachfolgenden systematischen Untersuchung auf klinisch relevante phänotypische Veränderungen. Im Phänotyp-basierten Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt wurden Mäuse des Inzuchtstammes C3H mit der Chemikalie Ethylnitroso-urea (ENU) behandelt, wodurch vor allem Punktmutationen induziert werden. Die Nachkommen der mutagenisierten Tiere wurden systematisch auf phänotypische Veränderungen untersucht. Auffällige Tiere wurden auf die Vererbbarkeit des interessierenden Phänotyps getestet, um mutante Mauslinien zu züchten. Anschließend wurde die ursächliche Mutation in den Linien identifiziert und die detaillierte funktionale Untersuchung der Mutation durchgeführt. Im Rahmen der klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchung haben wir eine Vielzahl mutanter Mauslinien mit dominanter oder rezessiver Mutation erstellt, die vererbare Veränderungen in verschiedenen Blutparametern zeigen. Die erstellten Linien wurden mit Hilfe tiefgefrorener Spermien konserviert und stehen zur Rederivation bereit. Um neue Mausmodelle für den Diabetes und für Nierenerkrankungen beim Menschen zu etablieren, fokussierte sich unsere Arbeit auf die Erstellung und Untersuchung mutanter Linien mit erhöhten Blutglukosewerten bzw. erhöhten Blutharnstoffwerten. Eine umfassende und standardisierte phänotypische Untersuchung neuer Mausmutanten wurde in der „German Mouse Clinic“ mit der Analyse von mehreren hundert Parametern durchgeführt.

### *Abstract*

Animal models are required for studying the pathobiology of diseases as well as for the development and evaluation of therapeutic strategies. A strategy for the establishment of novel mouse models for biomedical research consists of random mutagenesis of a large number of animals and the subsequent systematic analysis of relevant phenotypic parameters. In the phenotype-based Munich ENU mouse mutagenesis project, C3H inbred mice were treated with the chemical ethylnitroso-urea (ENU) which mainly generates point mutations. The offspring of the mutagenized mice were phenotypically examined, and animals with interesting phenotypes were analysed for the transmission of the altered phenotype to subsequent generations, thereby revealing a mutation as cause for the aberrant phenotype. In the established mutant lines, the underlying mutations were then identified by forward genetic strategies. This led to the identification of genes and/or alleles which may have counterparts relevant for human diseases. Use of clinical chemical and haematological phenotyping parameters led to the establishment of a great number of mutant lines harbouring dominant or recessive mutations and showing deviations in various blood parameters. The established mutant lines were cryo-preserved for their further analysis. We further concentrated on the genotypic and phenotypic analysis of mutant lines showing altered blood levels of glucose or urea to establish novel models for the biomedical research in the fields of diabetes and nephropathies, respectively. Novel mutants underwent a systemic, standardized phenotypic analysis in the “German Mouse Clinic” by using several hundred phenotyping parameters.

### **1. Einleitung**

Mäuse werden in der biomedizinischen Forschung genutzt, um genetische Faktoren zu erkennen, die prädisponierend oder protektiv für spezifische Erkrankungen wirken. Nach den aktuellen An-

gaben der MGI-Datenbank (<http://www.informatics.jax.org>) wurde bisher etwa für die Hälfte aller Säuger Gene mindestens ein mutantes Mausmodell publiziert. Neue Tiermodelle für die biomedizinische Forschung können durch zwei komplementäre Strategien erzeugt werden, den Gen-basierten Ansatz und den Phänotyp-basierten Ansatz. Der Gen-basierte Ansatz stellt die Untersuchung eines Gens entweder durch additiven Gentransfer oder durch Mutation des Gens im tierischen Organismus dar. Der in den genetisch veränderten Tieren zu beobachtende Phänotyp ist grundsätzlich wenig vorhersehbar, was die Erstellung von Tiermodellen für definierte menschliche Erkrankungen erschweren kann. Hier kann der Phänotyp-basierte Ansatz zur Erstellung neuer Tiermodelle Abhilfe schaffen, dem keine Annahmen zur genetischen Ursache von Phänotypen zugrunde liegen. Somit können auch Gene und/oder Allele entdeckt werden, deren Einfluss auf interessierende Phänotypparameter bisher unbekannt ist. Der Phänotyp-basierte Ansatz besteht in der zufälligen Mutagenese einer großen Anzahl von Tieren und der nachfolgenden systematischen Untersuchung auf klinisch relevante phänotypische Veränderungen. In mehreren Mutageneseprojekten wurden in verschiedenen Inzuchtstämmen männliche Mäuse mit der Chemikalie N-Ethyl-N-Nitrosourea (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) behandelt, die in den Spermatozyten effektiv und zufällig hauptsächlich Punktmutationen auslöst. Nach der Etablierung mutanter Linien mit phänotypischen Veränderungen wird die ursächliche Mutation mit Hilfe von „forward genetics“-Techniken identifiziert, womit ein neues mutantes Tiermodell etabliert ist.

In den meisten etablierten mutanten Linien führt die Punktmutation zum Austausch einer Aminosäure im betroffenen Protein („missense mutation“), wodurch der beobachtete pathologische Phänotyp ausgelöst wird. In verschiedenen Linien können zufällig im gleichen Gen verschiedene mutante Allele auftreten, was zur Bildung und Untersuchung von Allelserien eines Gens führen kann. Die nachfolgende Auszucht der ursächlichen Mutation auf den entsprechenden Wildtypmäusestamm führt zum Verlust der übrigen nichtursächlichen ENU-Mutationen, die nicht mit der ursächlichen Mutation gekoppelt sind. Verschiedene ENU-Mutanten eines Gens sowie ENU-Mutanten und *Knockout*-Tiere desselben Gens können verschiedene phänotypische Veränderungen zeigen und damit verschiedene Einsichten in die Funktion des betreffenden Gens geben (HRABÉ DE ANGELIS et al. 2007, ACEVEDO-AROEZA et al. 2008).

## 2. Das Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt

Im Phänotyp-basierten Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt wurden männliche Tiere des Inzuchtstammes C3HeB/FeJ (C3H) intraperitoneal mit der Chemikalie ENU behandelt, wodurch vor allem Punktmutationen induziert werden. Die mutagenisierten Männchen (Generation G0) wurden an weibliche Wildtyp-C3H-Tiere angepaart. Ihre Nachkommen wurden systematisch auf eine Vielzahl von phänotypischen Veränderungen untersucht. Auffällige Tiere wurden auf die Vererbbarkeit des interessierenden Phänotyps getestet, um mutante Mauslinien zu züchten. Die physiologischen Werte wurden dabei zuvor bei C3H-Wildtyp-Tieren erhoben. Im Allgemeinen wurde der 95%-Bereich der erhobenen Kontrollwerte als physiologisch definiert (HRABÉ DE ANGELIS et al. 2000).

Die Untersuchung auf dominante Mutationen wurde in Tieren der Generation 1 (G1) durchgeführt, die durch die Anpaarung der mutagenisierten G0-Männchen an weibliche C3H-Wildtyp-Tiere entstanden. Bei der Beobachtung eines abnormen Phänotyps in der G1-Generation wurde dessen Vererbbarkeit an G2-Nachkommen getestet, die durch die Anpaarung des auffälligen G1-Tieres an C3H-Wildtypmäuse erstellt wurden. Bei einer vollständigen Penetranz des abnormen

Phänotyps zeigte die Hälfte der Nachkommen wieder den auffälligen Phänotyp, womit eine neue mutante Linie etabliert war. Die Untersuchung des Phänotyps der homozygot mutanten Tiere solcher Linien wurde in der Regel nach der Identifizierung der ursächlichen Mutation durchgeführt.

Die Untersuchung auf rezessive Mutationen wurde in G3-Tieren durchgeführt, die in einem zweistufigen Zuchtschema mit G1-Tieren erstellt wurden, bei denen keine phänotypischen Anzeichen für das Vorliegen einer dominanten Mutation festgestellt wurden. Solche Tiere wurden an C3H-Wildtypmäuse angepaart, und die G2-Nachkommen entweder miteinander verpaart oder an das G1-Elterntier zurückgekreuzt. Die G3-Tiere wurden dann auf Veränderungen des Phänotyps untersucht. Bei der Beobachtung eines abnormen Phänotyps wurde dessen Vererbbarkeit in G5-Nachkommen untersucht, die aus einem G4-„Intercross“-Zuchtschema oder einem G4×G3-„Backcross“-Zuchtschema stammten. Bei Auftreten des auffälligen Phänotyps in den G5-Nachkommen war eine neue mutante Linie erstellt (HRABÉ DE ANGELIS et al. 2007) (Abb. 1).

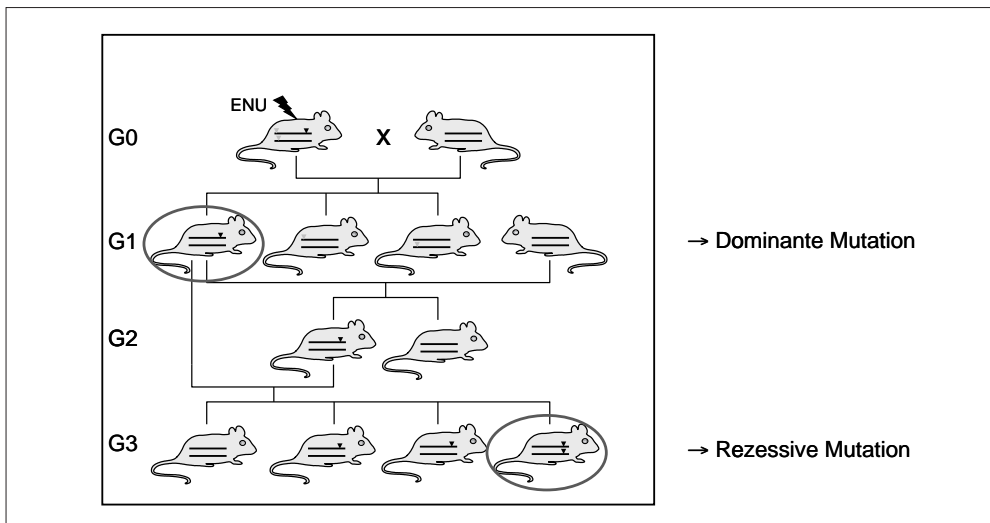


Abb. 1 Zuchtschema zur Erstellung von dominanten und rezessiven Varianten in einem ENU-Mausmutagenese-Projekt. Dreiecke auf den Balken zeigen die durch ENU zufällig induzierten Mutationen im Genom an (helle Dreiecke: Mutationen ohne erkennbare Konsequenzen für den Phänotyp; dunkles Dreieck: ursächliche Mutation für den auffälligen Phänotyp). Mit Kreisen markierte Tiere zeigen phänotypisch auffällige Tiere (dominante Variante, rezessive Variante), die durch weitere Zucht auf die Vererbbarkeit des betreffenden Phänotyps zu testen sind.

Zur systematischen phänotypischen Untersuchung wurden klinische Routinetests verwendet, die die effiziente Analyse einer großen Anzahl von Tieren auf ein breites Parameterspektrum erlaubten (<http://www.mouseclinic.de>). Das klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungsprofil des Projektes umfasste eine große Anzahl von Blutparametern, wie Elektrolyte, Enzymaktivitäten, Proteine und Substrate, sowie hämatologische Parameter des roten und weißen Blutbildes zur Erkennung von Defekten in verschiedenen Organsystemen und Stoffwechselwegen. Die Messung der Untersuchungsparameter erfolgte an drei Monate alten Tieren mindestens zweimal im Abstand von drei Wochen. Nach der entsprechenden Zucht der phänotypisch veränderten Tiere zeigte das Auftreten des veränderten Phänotyps bei den Nachkommen an, dass die Erstellung einer neuen mutanten Linie erfolgreich war und eine durch ENU induzierte Mutation die Ursache des spezifischen Phänotyps war (RATHKOLB et al. 2000,



KLEMPET et al. 2006). Für die Suche nach dominanten und rezessiven Mutationen wurden im Hauptprojekt mehr als 15000 G1-Mäuse und 500 G3-Familien untersucht.

Nach der Etablierung und Zucht von mutanten Mäuseliniem mit pathologischem Phänotyp über mehrere Generationen erfolgten die chromosomale Lokalisierung und die anschließende Identifizierung der für die Störung ursächlichen Mutation durch molekulargenetische Standardtechniken. Die chromosomale Lokalisierung der ursächlichen Mutation erfolgte in einer Kopplungsanalyse mit Tieren, die unter Verwendung eines zweistufigen Zuchtschemas und eines zweiten Inzuchtstammes gezüchtet wurden. Die Auswahl des zweiten Inzuchtstammes richtete sich nach dem auffälligen Phänotypparameter, wobei in der Regel C57BL/6 als zweiter Inzuchtstamm verwendet wurde. Für unsere Arbeit zur Erstellung und Untersuchung mutanter Linien mit erhöhten Blutharnstoffwerten wurde jedoch BALB/c als zweiter Inzuchtstamm verwendet, da C57BL/6-Mäuse relativ hohe Plasmaharnstoffwerte aufweisen und damit die eindeutige phänotypische Zuordnung der Nachkommen in phänotypisch mutante Tiere und phänotypische Wildtypiere erschwert ist.

Zur Kopplungsanalyse wurden für Linien mit dominanter Mutation phänotypisch heterozygot mutante Tiere des Inzuchtstammes C3H mit Tieren des zweiten Inzuchtstammes verpaart, die Nachkommen (F1-Hybride) auf den betreffenden Parameter untersucht und phänotypisch heterozygot mutante Tiere ein zweites Mal mit Tieren des zweiten Inzuchtstammes verpaart. Für Linien mit rezessiver Mutation wurden phänotypisch homozygot mutante Tiere des Inzuchtstammes C3H mit Tieren des zweiten Inzuchtstammes verpaart, und die heterozygot mutanten Nachkommen (F1-Hybride) – die keinen auffälligen Phänotyp zeigten – miteinander verpaart (Abb. 2).

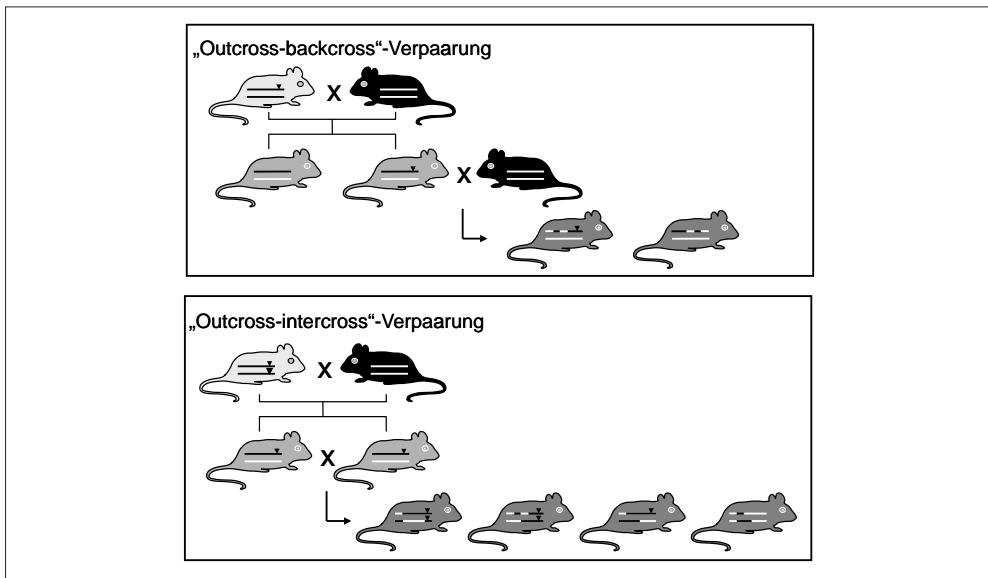


Abb. 2 Kopplungsanalyse zur Identifizierung der chromosomalen Lokalisation der den auffälligen Phänotyp auslösenden Mutation eines Phänotyp-basierten Ansatzes. *Oben:* Zucht für Linien mit dominanter Mutation; *unten:* Zucht für Linien mit rezessiver Mutation. Hell schraffiertes Tier: Phänotypisch mutantes Tier auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C3H; schwarz schraffiertes Tier: Tier des zweiten Inzuchtstammes. Nachkommen der ersten Anpaarung: F1-Hybride. Die Nachkommen der zweiten Verpaarung werden anhand des betreffenden Phänotypparameters in die zwei Gruppen der phänotypisch mutanten und phänotypisch nichtmutanten Tiere aufgeteilt und molekulargenetisch mit einem genomweiten Panel an polymorphen DNA-Markern untersucht.

Nachkommen der zweiten Verpaarung wurden anhand des betreffenden Untersuchungsparameters in die zwei Gruppen der phänotypisch mutanten und phänotypisch nichtmutanten Tiere aufgeteilt und molekulargenetisch mit einem genomweiten Panel an polymorphen DNA-Markern untersucht. Dies führte zur Identifizierung der chromosomalen Lokalisation der für die Störung ursächlichen Mutation. Die Identifizierung der ursächlichen Mutation erfolgte anschließend durch weitere Feinkartierung mit zusätzlichen polymorphen DNA-Markern und Kandidatengenanalyse (SILVER 1995, KEAYS et al. 2006). Seit einiger Zeit werden hierfür auch genomweite Exom- und/oder Transkriptomuntersuchungen eingesetzt (BOLES et al. 2009). Der Beweis, dass die identifizierte Mutation die ursächliche Mutation für den veränderten Phänotyp ist, ist durch funktionelle Untersuchungen zu führen. Im Anschluss wurde die detaillierte funktionale Untersuchung der Mutation in den Mauslinien durchgeführt.

### *2.1 Klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungsparameter*

Im Rahmen der klinisch-chemischen (Elektrolyte, Enzymaktivitäten, Proteine, Substrate) und hämatologischen Untersuchung haben wir im Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt eine Vielzahl mutanter Mauslinien mit dominanter oder rezessiver Mutation erstellt, die vererbare Veränderungen in bestimmten Blutparametern zeigen (Tab. 1). Die erstellten Linien wurden mit Hilfe tiefgefrorener Spermien konserviert und stehen zur Rederivation bereit.

Tab. 1 In der klinisch-chemischen und hämatologischen Blutuntersuchung des Münchener ENU-Mausmutagenese-Projektes etablierte mutante Mauslinien

<b>Parameter</b>	<b>Linien (n)<sup>[1]</sup></b>	<b>Referenz</b>
Elektrolyte	5	AIGNER et al. 2009b
Enzymaktivitäten	15	AIGNER et al. 2009a
Substrate		
Cholesterin ↑	9	MOHR et al. 2004
Cholesterin ↓	14	AIGNER et al. 2007b
Glukose ↑	4 (+5)	AIGNER et al. 2008
Harnstoff ↑	5 (+2)	AIGNER et al. 2007a
Eisenmetabolismus	3	In Bearbeitung
Hämatologie	17	AIGNER et al. 2011

[1] Linienzahlen in Klammern: Zusätzlich erstellte mutante Linien, die in der angegebenen Referenz nicht berücksichtigt sind.

So führte die Verwendung von Plasmacholesterin als Untersuchungsparameter zur Etablierung einer Anzahl an mutanten ENU-Linien mit erhöhten oder erniedrigten Gesamtcholesterinwerten im Blut (MOHR et al. 2004, AIGNER et al. 2007b). Eine Erhöhung oder veränderte Zusammensetzung der Blutfette (Hyper- und Dyslipoproteinämie) tritt in den meisten Fällen als multifaktorielle und polygenetisch bedingte Störung auf und spielt für die Entstehung und den Verlauf von verschiedenen multifaktoriellen Krankheiten des Menschen wie Herz- und

Kreislaufkrankungen und Alzheimer eine wichtige Rolle. Aufgrund artspezifischer Besonderheiten dieser Erkrankungen stellt die Maus kein optimales Modell zur Untersuchung der pathophysiologischen Konsequenzen der Dyslipoproteinämie dar, ist aber das Modelltier der Wahl, um nach noch unbekanntem genetischen Faktoren zu suchen, die die Blutfettwerte beeinflussen.

Die Bestimmung der physiologischen Gesamtcholesterinwerte im Blutplasma ergab Werte von  $132 \pm 15$  mg/dl (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) in männlichen C3H-Kontrolltieren und  $109 \pm 17$  mg/dl in weiblichen C3H-Kontrolltieren. Gesamtcholesterinwerte außerhalb des 95%-Referenzbereiches der Kontrollgruppen (100–160 mg/dl bei männlichen und 75–140 mg/dl bei weiblichen C3H-Mäusen) wurden als Hypo- bzw. Hypercholesterinämie definiert. Es wurden neun mutante Linien mit dem pathologischen Phänotyp der Hypercholesterinämie etabliert. Sechs der Linien wiesen eine dominante Vererbung des auffälligen Phänotyps auf, und die übrigen drei Linien zeigten eine rezessive Vererbung. Die Durchschnittswerte des Gesamtcholesterins für die männlichen und weiblichen Mutanten der neun Linien lagen bei 170–230 mg/dl und 150–200 mg/dl. In fünf der neun Linien wurde eine hohe phänotypische Penetranz der Hypercholesterinämie beobachtet, während die übrigen vier Linien eine unvollständige phänotypische Penetranz verschiedenen Grades zeigten (MOHR et al. 2004). Weiterhin wurden 14 unabhängige mutante Linien mit dem pathologischen Phänotyp der Hypocholesterinämie etabliert. Zwölf der Linien wiesen eine dominante Vererbung des auffälligen Phänotyps auf, und die übrigen zwei Linien zeigten eine rezessive Vererbung. Die Durchschnittswerte des Gesamtcholesterins für die männlichen und weiblichen Mutanten der 14 Linien lagen bei 62–95 mg/dl und 53–68 mg/dl. In zwölf der 14 Linien wurde eine hohe phänotypische Penetranz der Hypocholesterinämie beobachtet. Die Mehrzahl der etablierten mutanten Mauslinien mit Hypo- bzw. Hypercholesterinämie zeigten keine offensichtlichen Veränderungen in den weiteren, gemessenen klinisch-chemischen Blutparametern und erschienen unauffällig in der allgemeinen klinischen Untersuchung. Damit ist davon auszugehen, dass diese Linien Mutationen tragen, die primär die Homöostase der Blutcholesterinwerte beeinflussen (AIGNER et al. 2007b).

Ein Fokus unserer Arbeit besteht in der Erstellung und Untersuchung mutanter Linien aus dem Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt, die erhöhte Blutglukosewerte bzw. erhöhte Blutharnstoffwerte aufweisen, um neue Mausmodelle für den Diabetes und für Nierenerkrankungen zu etablieren.

## 2.2 Blutglukose als Untersuchungsparameter

Die Bestimmung der physiologischen Glukosewerte im Blutplasma ergab Werte von  $128 \pm 47$  mg/dl (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) in männlichen C3H-Kontrolltieren und  $123 \pm 47$  mg/dl in weiblichen C3H-Kontrolltieren. Im Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt wurde zur Bestimmung einer Hyperglykämie ein Schwellenwert von 200 mg/dl nach zweimaliger Messung bei männlichen und weiblichen Tieren verwendet (AIGNER et al. 2008). Die Verwendung des Parameters Plasmaglukose führte zur Etablierung von neun mutanten Linien. Drei der neun Linien zeigten die ursächliche Mutation im Gen Insulin 2 (*Ins2*), und weitere fünf Linien im Gen Glukokinase (*Gck*). Dabei wurden die Linien teilweise ohne die Durchführung einer Kopplungsanalyse auf die Kandidatengene *Gck* und *Ins2* untersucht. Eine weitere Linie mit unveränderter kodierender Region für *Gck* und *Ins2* ist aktuell weiter in Untersuchung (Tab. 2).

Tab. 2 Mutante Mauslinien des Münchener ENU-Mausmutagenese-Projektes mit erhöhten Blutglukosewerten

Linie (interne Bezeichnung) <sup>[1]</sup>	Kopplungsanalyse <sup>[2]</sup>	Mutation
GLS004	ja	<i>Ins2</i> <sup>C95S</sup> (HERBACH et al. 2007)
GLS015	–	<i>Ins2</i> <sup>V26D</sup>
GLS001	ja	<i>Gck</i> <sup>M210R</sup> (VAN BÜRCK et al. 2010)
GLS006	ja	<i>Gck</i> <sup>D217V</sup> (VAN BÜRCK et al. 2012)
GLS007	–	<i>Gck</i> <sup>S212P</sup>
GLS008	–	<i>Gck</i> <sup>M393K</sup>
GLS013	–	<i>Gck</i> : nt 1 des Intron 2: G → A
GLS014	–	kodierende Sequenz von <i>Gck</i> und <i>Ins2</i> : ok

[1] Eine mutante Linie mit der ursächlichen Mutation im Gen *Ins2* ist nicht aufgeführt.

[2] Linien wurden teilweise ohne Kopplungsanalyse auf die Kandidatengene *Gck* und *Ins2* untersucht. nt, Nukleotid.

Insulin (*INS*) codiert ein Protein, das aus zwei Polypeptiden (A- und B-Kette) besteht, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Zusätzlich besitzt die A-Kette eine weitere Disulfidbindung innerhalb der Kette. Mäuse besitzen zwei Insulingene (*Ins1* und *Ins2*). Für das Gen *Ins2* ist als Mausmodell bereits die Mutante *Ins2*<sup>C96Y</sup> („Akita“) publiziert, bei der durch den Aminosäureaustausch eine Disulfidbindung zwischen A- und B-Kette nicht ausgebildet werden kann. Die mutanten Tiere entwickeln einen Diabetes aufgrund einer Betazell-dysfunktion. Das mutierte Insulinmolekül bewirkt dabei einen dominant negativen Effekt auf die Betazellen des Pankreas (YOSHIOKA et al. 1997). Unsere drei erstellten Mauslinien zeigen Punktmutationen im *Ins2*-Gen, die zum Austausch einer Aminosäure an verschiedenen Stellen des reifen Proteins führen.

Wir haben eine unserer drei Linien näher untersucht. Die dominant mutante Linie *Ins2*<sup>C95S</sup> wurde mit Hilfe der G1-Maus Nr. 20016135 mit starker Hyperglykämie (276 und 335 mg/dl) erstellt. Die mutante Linie wurde über mehr als zehn Generationen gezüchtet, ohne den spezifischen Phänotyp zu verlieren. Nach Lokalisierung der ursächlichen Mutation mit Hilfe einer Kopplungsanalyse in der Nähe des DNA-Markers rs13479566 auf Chromosom 7 wurde bei der Sequenzierung von *Ins2* als Kandidatengen im Exon 3 bei Nukleotid 1903 eine T→A-Transversion detektiert, die zum Aminosäureaustausch C95S führt, was mit dem Verlust der A6-A11-Intrakettendisulfidbindung des Insulinproteins verbunden ist (HERBACH et al. 2007). *In-vitro*-Studien mit solchen mutanten Insulinproteinen zeigten, dass die fehlgefalteten Moleküle nur mit geringer Effizienz aus den Betazellen des Pankreas sezerniert werden können. Damit kommt es zu einer Störung der Funktion des endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress), die schließlich zum Zelltod führen kann (LIU et al. 2005).

In der klinischen Untersuchung wiesen die heterozygot mutanten Tiere der Linie *Ins2*<sup>C95S</sup> im Vergleich zu Kontrolltieren ab einem Alter von einem Monat signifikant erhöhte Blutzuckerspiegel sowie Störungen der Glukosetoleranz und der glukose-induzierten Insulinsekretion auf. Männliche heterozygote Mutanten entwickelten ab dem zweiten Lebensmonat einen offensichtlichen und progressiven Diabetes mellitus. Diese starke Progression war bei weiblichen heterozygoten Mutanten nicht festzustellen. In der morphologischen Untersuchung wurde bei sechs Monate alten männlichen heterozygoten Mutanten eine stark ausgeprägte Reduktion des Gesamtinsel- und Gesamtbetazellvolumens festgestellt. Elektronenmikroskopische Un-

tersuchungen offenbarten schwere Strukturveränderungen der Betazellen. Das mutierte Insulinmolekül zeigte somit einen dominant negativen Effekt auf die Betazellen des Pankreas (HERBACH et al. 2007). Damit entwickelten die Tiere einen ähnlichen Diabetesphänotyp wie die publizierte mutante Linie *Ins2*<sup>C96Y</sup> („Akita“). Dies ist auch für unsere zwei weiteren erstellten Mauslinien mit einer Mutation im Gen *Ins2* zu erwarten.

Das Enzym Glukokinase (GCK) katalysiert den ersten Schritt der Glykolyse und wird deshalb als „Glukosesensor“ bezeichnet. Beim Menschen sind heterozygote Mutationen im Gen Glukokinase (*GCK*), die zu einer verminderten Enzymaktivität führen, Ursache einer spezifischen Form des Diabetes, der als „maturity-onset diabetes of the young type 2“ (MODY 2) bezeichnet wird. Es sind mehrere hundert verschiedene Mutationen in der kodierenden Region des Gens beschrieben. Die Erstellung und Untersuchung von *Gck*-mutanten Mauslinien zur Verwendung als Tiermodell für MODY 2 wurde sowohl im Rahmen weiterer ENU-Mausmutagenese-Projekte als auch in anderen Projekten beschrieben (<http://www.informatics.jax.org>; AIGNER et al. 2008).

Im Rahmen unseres Projektes wurden zwei der fünf erstellten *Gck*-mutanten ENU-Linien – Linie *Gck*<sup>M210R</sup> und Linie *Gck*<sup>D217V</sup> – klinisch und pathomorphologisch untersucht. Adulte mutante Tiere der Linie *Gck*<sup>M210R</sup> zeigten eine signifikante Reduktion der hepatischen GCK-Enzymaktivität, aber eine unveränderte mRNA- und Proteinexpression des Gens. Homozygot mutante Tiere zeigten eine hochgradige Hyperglykämie und Wachstumsstörungen und starben kurz nach der Geburt. Heterozygot mutante Tiere wiesen von Geburt an leicht erhöhte Plasmaglukosewerte auf und entwickelten Störungen in der Glukosetoleranz und der glukose-induzierten Insulinsekretion. In sieben Monate alten männlichen heterozygoten Mutanten war eine signifikante Verringerung des Gesamtinsel- und Betazellvolumens sowie des Gesamtvolumens der isolierten Betazellen zu finden. Weibliche heterozygote Mutanten waren davon nicht betroffen. Die mutante Linie *Gck*<sup>M210R</sup> – wie auch die mutante Linie *Gck*<sup>D217V</sup> – entwickelte somit einen Phänotyp, der den Phänotypen ähnlich war, die in anderen *Gck*-mutanten Mauslinien und bei MODY 2 des Menschen beobachtet wurden (VAN BÜRCK et al. 2010, 20012).

Insgesamt zeigte die Verwendung von Plasmaglukose als Untersuchungsparameter – wie auch für andere ENU-Mausmutagenese-Projekte beschrieben – einen begrenzten Wert für die Erstellung neuer mutanter Mauslinien, die die ursächliche Mutation in Genen aufweisen, deren Einfluss auf die Ausbildung von Diabetes bisher unbekannt war. Jedoch können grundsätzlich verschiedene ENU-Mutanten desselben Gens verschiedene phänotypische Veränderungen zeigen und damit verschiedene Einsichten in die Funktion des betreffenden Gens geben. So wurden auch im Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt für die Gene *Gck* und *Ins2* neue Allelvarianten etabliert und mit den mutanten Linien neue pathomorphologische Erkenntnisse gewonnen. Die diabetischen Mausmodelle mit den neuen Allelvarianten bieten die Möglichkeit, sowohl die Veränderungen des endokrinen Pankreas zu charakterisieren und die Ursachen des Betazellverlustes zu untersuchen als auch neue therapeutische Interventionsstrategien zu entwickeln.

### 2.3 Blutharnstoff als Untersuchungsparameter

Die Bestimmung der physiologischen Harnstoffwerte im Blutplasma ergab Werte von  $48 \pm 11$  mg/dl (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) in männlichen C3H-Kontrolltieren und  $41 \pm 11$  mg/dl in weiblichen C3H-Kontrolltieren. Zur Bestimmung erhöhter Plasmaharnstoffwerte wurde ein

Schwellenwert von 70 mg/dl nach zweimaliger Messung bei männlichen und weiblichen Tieren verwendet (AIGNER et al. 2007a). Die Verwendung des Parameters Plasmaharnstoff führte bisher zur Etablierung von sieben mutanten Linien. Bei sechs dieser Linien wurde die ursächliche Mutation bereits identifiziert. Zwei dieser sechs ENU-Linien zeigten eine Mutation im Gen Uromodulin (*Umod*) (KEMTER et al. 2009, 2013), und zwei weitere Linien zeigten eine Mutation in Genen (z. B. *Slc12a1*, KEMTER et al. 2010), für die bereits *Knockout*-Mausmodelle beschrieben sind, die jedoch im homozygoten Zustand eine perinatale Letalität aufwiesen. Die beiden übrigen Linien zeigten eine Mutation in Genen, für die bisher noch kein Mausmodell publiziert ist. Insgesamt wurden somit durch die Verwendung von Plasmaharnstoff als Untersuchungsparameter neue mutante Mauslinien für die biomedizinische Forschung erstellt. In anderen ENU-Mausmutagenese-Projekten ist die Verwendung von Plasmaharnstoff als Untersuchungsparameter nicht publiziert.

#### 2.4 Zwei ENU-Linien mit Mutationen im Gen *Umod*

Uromodulin (*UMOD*) codiert ein Glykoprotein, das vor mehr als 60 Jahren als Tamm-Horsfall-Glykoprotein (THP) identifiziert wurde und das das mengenmäßig am häufigsten im Harn von Säugern vorkommende Protein darstellt. Es wird ausschließlich in Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henleschen Schleife synthetisiert (TALH-Zellen). Nach der Synthese wird das Uromodulin-Vorläuferprotein innerhalb des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates zum reifen Glykoprotein prozessiert, zur luminalen Membran transportiert und mit dem Harn ausgeschieden. Über die genaue Funktion von *UMOD* ist wenig bekannt.

Beim Menschen sind vor allem heterozygote *UMOD*-Mutationen bekannt, die zu einem dominant vererblichen Krankheitssyndrom führen, das als Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankung (UAKD, *Uromodulin-Associated Kidney Disease*) oder „*Uromodulin Storage Disease*“ zusammengefasst wird. Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine Störung der TALH-Zellen, die durch die gestörte Prozessierung des mutanten Uromodulins ausgelöst wird. Dies führt zu einer Störung der Ausscheidung von Harnsäure (meist mit Ausbildung von Gicht), zu geringen Defekten der Harnkonzentrierungsfähigkeit und zu variablen Ausbildungen des Krankheitsverlaufes, wobei auch Nierenversagen auftreten kann. Histologische Untersuchungen der Nieren zeigen dabei das Auftreten einer tubulointerstitiellen Fibrose mit moderaten Entzündungszellinfiltraten und Zysten. Die klinischen Aspekte der UAKD beim Menschen sind heterogen, auch innerhalb der betroffenen Familien, und unabhängig vom Typ und der Lage der Mutation. Nierendefekte stellen somit das Hauptsymptom bei *UMOD*-Mutationen des Menschen dar (BLEYER und HART 2011, BLEYER et al. 2011).

Im Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt zeigten zwei mutante Linien auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C3H eine Punktmutation im Gen Uromodulin (*Umod*). Daraus resultierte der Austausch einer Aminosäure an verschiedenen Stellen des Proteins (*Umod*<sup>C93F</sup> [KEMTER et al. 2013] und *Umod*<sup>A227T</sup> [KEMTER et al. 2009]). Analog zu den funktionellen Nierendefekten der UAKD des Menschen zeigten diese beiden mutanten Mauslinien ebenfalls erhöhte Plasmawerte für Harnstoff und Kreatinin als Marker für das Vorliegen eines Nierendefektes. Das mutante Uromodulin führte zur Dysfunktion der TALH-Zellen („gain-of-toxic function“) aufgrund der gestörten Prozessierung des mutanten Uromodulins. Dabei beeinflussten der Typ der Mutation und der Allelstatus den Beginn, den Schweregrad und den Verlauf der Krankheitssymptome. So war der Schweregrad der Nierenveränderungen in heterozygoten *Umod*<sup>C93F</sup>-Mutanten und homozygoten *Umod*<sup>A227T</sup>-Mutanten ähnlich ausgeprägt.



Bisher sind verschiedene weitere *Umod*-mutante Mausmodelle publiziert. Zwei funktionelle *Knockout*-Modelle wurden auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes 129/Sv und/oder C57BL/6 etabliert. Im Vergleich zu Wildtypmäusen wiesen die homozygoten *Knockout*-Tiere beider Linien keine Veränderungen in Entwicklung und Wachstum sowie in Verhalten und Fertilität auf. Die histologische Untersuchung der Nieren zeigte auch keine offensichtlichen Veränderungen, und es waren nur geringe Veränderungen in der Nierenfunktion auszumachen. Insgesamt offenbarten die publizierten *Knockout*-Mausmodelle für *Umod* kaum Veränderungen, die auf einen Nierendefekt schließen lassen. Dies weist darauf hin, dass der Verlust der Expression von UMOD nicht ausreicht, um UAKD auszulösen (BATES et al. 2004, MO et al. 2004).

Des Weiteren wurden zwei transgene Mauslinien publiziert, die zusätzlich zum endogenen *Umod*-Gen durch additiven Gentransfer eine mutante Form des UMOD exprimieren. Die erste transgene Linie exprimierte das humane Uromodulin mit der Mutation C148W – die als eine ursächliche *UMOD*-Mutation für UAKD des Menschen bekannt ist – unter der Kontrolle des murinen *Umod*-Promotors in C57BL/6-Inzuchtmäusen. In den transgenen Tieren wurde eine Anreicherung von Uromodulin in den TALH-Zellen beobachtet. Jedoch war die Ausscheidung von murinem Uromodulin im Harn nicht verringert, und es wurden auch in älteren Tieren keine klinischen Anhaltspunkte für eine gestörte Nierenfunktion gefunden (TAKIUE et al. 2008). Die zweite transgene Linie exprimierte das murine Uromodulin mit der korrespondierenden Mutation C147W auf dem genetischen Hintergrund von FVB/N-Inzuchtmäusen. Diese transgenen Tiere zeigten in einem Alter von sechs Monaten klinische Symptome einer stark ausgeprägten UAKD und Nierendefekte mit Tubulusnekrosen (BERNASCONE et al. 2010).

Zusammenfassend wiesen die beiden im Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt etablierten Linien mit einer Punktmutation im Gen *Umod* den Austausch einer Aminosäure an verschiedenen Stellen des Proteins auf (*Umod*<sup>C93F</sup> [KEMTER et al. 2013] und *Umod*<sup>A227T</sup> [KEMTER et al. 2009]). Die publizierten *Knockout*-Mausmodelle für *Umod* zeigen kaum Veränderungen, die auf einen Nierendefekt schließen lassen, während hingegen Nierendefekte das Hauptsymptom bei *UMOD*-Mutationen des Menschen darstellen. Ausgeprägte Nierendefekte mit Verminderung der Urinkonzentrierungsfähigkeit, starker Verminderung der Harnsäureausscheidung, verändertem Metabolismus der divalenten Kationen und progressiven morphologischen Nierenveränderungen sind auch bei unseren beiden *Umod*-mutanten ENU-Linien zu finden, womit diese Linien als neue Tiermodelle für die entsprechenden menschlichen Erkrankungen dienen können.

## 2.5 Systematische und standardisierte phänotypische Untersuchung in der „German Mouse Clinic“

Außer der Funktion von *UMOD* in der Niere ist bisher wenig über dieses Gen bekannt. Dies war der Anlass, unsere beiden *Umod*-mutanten ENU-Linien in der „German Mouse Clinic“ (Institut für Experimentelle Genetik, Helmholtz-Zentrum München) zu untersuchen, wobei die systematische, umfassende und standardisierte phänotypische Untersuchung mehrere hundert Parameter umfasst und dazu dient, in mutanten Mäusen unbekannt primäre und/oder sekundäre Veränderungen aufzudecken. Die grundlegende Analyse umfasst die Bereiche Allergie, Verhalten, kardiovaskuläre Untersuchung, klinische Chemie, Dysmorphologie, einschließlich Knochen- und Knorpeluntersuchung, Energiemetabolismus, Augenuntersuchung, Immunologie, Lungenfunktion, molekulare Phänotypisierung mittels RNA-Expressionsun-

tersuchung, Neurologie, Nozizeption, Steroidmetabolismus und Pathologie. Entsprechend den Ergebnissen können weiterführende Untersuchungen in ausgewählten Gebieten durchgeführt werden. Die standardisierten Untersuchungsprotokolle sind online einzusehen (<http://www.mouseclinic.de>; GAILUS-DURNER et al. 2009, FUCHS et al. 2011, 2012). Die phänotypische Untersuchung mutanter Mäuse in der „German Mouse Clinic“ dient auch der Sammlung und unbeschränkten Verbreitung von systematisch erhobenen, umfassenden Phänotypdaten einer großen Anzahl an mutanten Mäusemodellen. Deshalb sind die Berichte der Untersuchungen online einzusehen (<http://146.107.35.38/phenomap/jsp/annotation/public/phenomap.jsf>).

Für die Untersuchung in der „German Mouse Clinic“ wurden heterozygot mutante und homozygot mutante Tiere der Linie *Umod*<sup>A227T</sup> in einem Alter von 2 bis 4 Monaten sowie heterozygot mutante Tiere der Linie *Umod*<sup>C93F</sup> im Alter von 7 bis 10 Monaten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren beiderlei Geschlechts untersucht. Die Untersuchung bestätigte den Nierendefekt.

Morphologisch war bei beiden mutanten Linien ein deutlich reduziertes Körpergewicht (10 % und 13 % in männlichen und weiblichen heterozygoten Mutanten der Linie *Umod*<sup>A227T</sup>, 15 % und 24 % in männlichen und weiblichen homozygoten Mutanten der Linie *Umod*<sup>A227T</sup> sowie 20–29 % und 27–35 % in männlichen und weiblichen heterozygoten Mutanten der Linie *Umod*<sup>C93F</sup>) auffällig. Die Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA)-Untersuchung zur Analyse der Körperzusammensetzung erbrachte als Ursache eine hochgradige Reduktion der Fettmasse und des Fettgehaltes (Prozent Körperfett) in diesen Tieren. Der Beginn des Auftretens des verringerten Körpergewichts wurde in der Linie *Umod*<sup>C93F</sup> etwa zur gleichen Zeit wie der Beginn der klinischen Nierenveränderungen beobachtet. Somit ist zumindest der Beginn des Auftretens des verringerten Körpergewichts nicht die Folge einer chronischen Niereninsuffizienz, da die Jungtiere nur milde Symptome einer Nierendysfunktion aufwiesen. Die Untersuchung des Energiemetabolismus offenbarte, dass die mutanten Tiere trotz geringerem Körpergewicht eine höhere Futteraufnahme als die Kontrolltiere zeigten. Zusätzlich war die Körpertemperatur der mutanten Tiere vermindert (KEMTER et al. 2009, 2013). Der Grund dafür ist in weiteren Studien abzuklären. Offensichtliche metabolische Veränderungen wurden in den bisher publizierten *Umod*-mutanten Mausmodellen nicht beschrieben, was sowohl die beiden *Knock-out*-Modelle (BATES et al. 2004, MO et al. 2004) als auch die beiden transgenen Linien mit additivem Gentransfer (TAKIUE et al. 2008, BERNASCONE et al. 2010) einschließt. Dieser Phänotyp wurde auch bei *UMOD*-Mutationen des Menschen bisher nicht untersucht.

Daneben wurden in den mutanten Tieren der beiden Linien *Umod*<sup>C93F</sup> und *Umod*<sup>A227T</sup> erhöhte Plasmakalziumwerte und erhöhte Plasmaaktivitäten der alkalischen Phosphatase (ALP) gemessen. Die Analyse des Skeletts mittels DXA ergab einen Effekt der Mutationen auf Skelettparameter in Form einer Verminderung der Knochendichte und des Knochenmineralgehaltes. Dies ist als sekundäre Veränderung in Folge des Nierendefektes zu erklären (KEMTER et al. 2009, 2013). Auch dieser Phänotyp wurde bisher weder bei den übrigen *Umod*-mutanten Mausmodellen noch bei *UMOD*-Mutationen des Menschen untersucht.

Zusammenfassend erbrachte die systematische, umfassende und standardisierte Untersuchung der beiden mutanten Mauslinien *Umod*<sup>C93F</sup> und *Umod*<sup>A227T</sup> auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C3H neben der Bestätigung des primär untersuchten Nierendefektes eine Anzahl weiterer Veränderungen, wie Veränderungen im Körpergewicht, der Körperzusammensetzung, des Knochenstoffwechsels, des Energiemetabolismus sowie der hämatologischen Parameter. Diese Effekte wurden bisher weder bei den übrigen publizierten



*Umod*-mutanten Mausmodellen noch bei *UMOD*-Mutationen des Menschen beschrieben bzw. untersucht.

## 2.6 Eine ENU-Linie mit der Mutation im Gen *Slc12a1*

Eine weitere im Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt etablierte mutante Linie mit erhöhten Blutharnstoffwerten als Parameter zur Erstellung neuer Mausmodelle für Nierenerkrankungen stellt die Linie *Slc12a1*<sup>I299F</sup> dar. Das Gen *Slc12a1* (*Solute Carrier Family 12 Member 1*) codiert den Bumetanid-sensitiven Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Ionen-transporter NKCC2. Auch in der Linie *Slc12a1*<sup>I299F</sup> führt die durch ENU induzierte Punktmutation zum Austausch einer Aminosäure im Protein SLC12A1. Die betroffene Aminosäure sowie die gesamte betroffene Region des Proteins sind in Wirbeltieren hochkonserviert. Das Protein ist im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife lokalisiert, wo es eine essenzielle Rolle in der Salzreabsorption und der Harnkonzentrierungsfähigkeit und damit im Salz- und Wasserhaushalt des Körpers einnimmt. Es ist verantwortlich für den Salztransport in der Niere (KEMTER et al. 2010 und darin zitierte Literatur).

Beim Menschen verursacht der durch Mutationen ausgelöste Funktionsverlust von *SLC12A1* das Bartter-Syndrom Typ I, das durch hochgradige Polyurie, Tubulopathie mit starkem Salzverlust, niedrigem Blutdruck und Hyperreninämie charakterisiert ist und bereits pränatal auftritt. *Knockout*-Mausmodelle mit dem vollständigen Fehlen von NKCC2 werden normal geboren, zeigen die Ausbildung einer hochgradigen Hydronephrose und sterben perinatal innerhalb der ersten beiden Lebenswochen aufgrund eines massiven Nierenversagens und der damit verbundenen metabolischen Konsequenzen (TAKAHASHI et al. 2000). *Knockout*-Mäuse mit der funktionellen Ausschaltung nur einer der beiden Isoformen A oder B des Proteins zeigen nur geringgradige phänotypische Veränderungen (OPPERMANN et al. 2006, 2007).

Die Mutation *Slc12a1*<sup>I299F</sup> ist lokalisiert in einem Bereich des Proteins, der in allen funktionellen Isoformen vorkommt und für die Ionenbindung zuständig ist. Homozygot mutante Tiere der Linie *Slc12a1*<sup>I299F</sup> sind lebensfähig und zeigen keine offensichtlichen Veränderungen in Wachstum, Verhalten und Reproduktion. Das Körpergewicht von drei Monate alten homozygoten Mutanten wies keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu Kontrolltieren auf. Die Plasmaharnstoffwerte sind stark erhöht, während die Plasmakreatininwerte nur leicht erhöht sind, wobei die Ausscheidung von Kreatinin sogar höher ist als in Wildtyp-Kontrolltieren. Homozygot mutante Tiere zeigen eine massive Störung der Harnkonzentrierungsfähigkeit, was zu starker Polydipsie und Polyurie führt. Zusätzlich ist die Ausscheidung von Kalzium und Magnesium mit dem Harn erhöht, während die Ausscheidung von Harnsäure mit dem Harn verringert ist. Die morphologische und histologische Untersuchung erbrachte häufig uni- oder bilaterale Nierenbeckendilatationen unterschiedlichen Schweregrades gepaart mit einer Atrophie der Nierenpapillen. Gelegentlich wurde eine Nephrokalzinose festgestellt. Die Läsionen verschlimmerten sich mit dem Alter und schienen in männlichen Tieren häufiger zu sein. Heterozygot mutante Tiere zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren kaum morphologische oder klinische Veränderungen.

Auch die Linie *Slc12a1*<sup>I299F</sup> wurde in der „German Mouse Clinic“ einer systematischen und standardisierten phänotypischen Untersuchung unterzogen. Homozygot mutante Tiere wiesen eine signifikante Erniedrigung des mittleren arteriellen Blutdrucks sowie des systoli-

schen und diastolischen Blutdrucks auf. Die Herzfrequenz war nicht verändert. Um den Langzeiteffekt der vermehrten Ausscheidung von Kalzium im Harn zu untersuchen, wurde eine periphere quantitative Computertomographie (pQCT)-Analyse des Skelettes durchgeführt. Die kortikale Knochenmineraldichte, gemessen am Oberschenkelknochen, war in neun Monate alten homozygot mutanten Tieren signifikant verringert. Der Phänotyp der Osteopenie wies zusammen mit den erhöhten Plasmakalziumwerten und der erhöhten Plasmaaktivität für die alkalische Phosphatase (ALP) auf einen erhöhten Knochenumsatz und/oder auf Störungen der Knochenmineralisation bei den homozygoten Mutanten hin (KEMTER et al. 2010).

Zusammenfassend zeigte die mutante Linie *Slc12a1* die meisten Merkmale des Bartter-Syndroms Typ I mit einer spät auftretenden Manifestation der Symptome und ermöglicht als neue Allelvariante die weitere funktionelle Untersuchung eines Gens *in vivo*, das in homozygoten *Knockout*-Mäusen zur perinatalen Letalität führt.

### **3. Schlussfolgerung**

Die Untersuchung einer großen Anzahl an G1- und G3-Nachkommen mutagenisierter Tiere im Phänotyp-basierten Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekt mit Hilfe der beiden Untersuchungsparameter Blutglukose und Blutharnstoff führte zur Erstellung von Tiermodellen für den Diabetes und für Nierenerkrankungen beim Menschen. Für die erstellten Diabetesmodelle sind schon ähnliche Mausmodelle publiziert. Jedoch wurden auch mit Blutglukose als Untersuchungsparameter neue Allelvarianten etabliert und mit den mutanten Linien neue pathomorphologische Erkenntnisse gewonnen. Die etablierten ENU-Linien für Nierenerkrankungen stellen neue Mausmodelle dar, deren weitere genetische und phänotypische Analyse neue Erkenntnisse für die entsprechenden Erkrankungen beim Menschen erbringt. Hierbei wurden mutante Linien mit neuen Allelvarianten für Gene etabliert, für die entweder noch kein mutantes Mausmodell beschrieben ist oder für die bereits *Knockout*-Mausmodelle beschrieben sind, die jedoch im homozygoten Zustand eine perinatale Letalität zeigen, oder für die bereits *Knockout*-Mausmodelle und transgene Linien mit additivem Gentransfer beschrieben sind, die die entsprechende humane Erkrankung jedoch weniger gut abbilden als die neuen ENU-Linien.

#### *Dank*

Die Untersuchungen wurden im Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie (Prof. Dr. E. WOLF) der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. WANKE im Institut für Tierpathologie der LMU München und dem Institut für Experimentelle Genetik (Prof. Dr. M. HRABÉ DE ANGELIS) des Helmholtz-Zentrums München, Neuherberg, einschließlich der dort ansässigen „German Mouse Clinic“, durchgeführt.

#### *Literatur*

- ACEVEDO-AROZENA, A., WELLS, S., POTTER, P., KELLY, M., COX, R. D., and BROWN S. D.: ENU mutagenesis, a way forward to understand gene function. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 49–69 (2008)
- AIGNER, B., RATHKOLB, B., HERBACH, N., HRABÉ DE ANGELIS, M., WANKE, R., and WOLF, E.: Diabetes models by screen for hyperglycemia in phenotype-driven ENU mouse mutagenesis projects. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E232–E240 (2008)

- AIGNER, B., RATHKOLB, B., HERBACH, N., KEMTER, E., SCHESSL, C., KLAFTEN, M., KLEMP, M., HRABÉ DE ANGELIS, M., WANKE, R., and WOLF, E.: Screening for increased plasma urea levels in a large-scale ENU mouse mutagenesis project reveals kidney disease models. *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* 292, F1560–F1567 (2007a)
- AIGNER, B., RATHKOLB, B., KLAFTEN, M., SEDLMEIER, R., KLEMP, M., WAGNER, S., MICHEL, D., MAYER, U., KLOPSTOCK, T., HRABÉ DE ANGELIS, M., and WOLF, E.: Generation of N-ethyl-N-nitrosourea-induced mouse mutants with deviations in plasma enzyme activities as novel organ-specific disease models. *Exp. Physiol.* 94, 412–421 (2009a)
- AIGNER, B., RATHKOLB, B., KLEMP, M., WAGNER, S., MICHEL, D., HRABÉ DE ANGELIS, M., and WOLF, E.: N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis produced a small number of mice with altered plasma electrolyte levels. *J. Biomed. Sci.* 16, 53 (2009b)
- AIGNER, B., RATHKOLB, B., KLEMP, M., WAGNER, S., MICHEL, D., KLAFTEN, M., LAUFS, J., SCHNEIDER, B., SEDLMEIER, R., HRABÉ DE ANGELIS, M., and WOLF, E.: Generation of N-ethyl-N-nitrosourea-induced mouse mutants with deviations in hematological parameters. *Mamm. Genome* 22, 495–505 (2011)
- AIGNER, B., RATHKOLB, B., MOHR, M., KLEMP, M., HRABÉ DE ANGELIS, M., and WOLF, E.: Generation of ENU-induced mouse mutants with hypocholesterolemia: novel tools for dissecting plasma lipoprotein homeostasis. *Lipids* 42, 731–737 (2007b)
- BATES, J. M., RAFFI, H. M., PRASADAN, K., MASCARENHAS, R., LASZIK, Z., MAEDA, N., HULTGREN, S. J., and KUMAR, S.: Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney Int.* 65, 791–797 (2004)
- BERNASCONE, I., JANAS, S., IKEHATA, M., TRUDU, M., CORBELL, A., SCHAEFFER, C., RASTALDI, M. P., DEVUYST, O., and RAMPOLDI, L.: A transgenic mouse model for uromodulin-associated kidney diseases shows specific tubulointerstitial damage, urinary concentrating defect and renal failure. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2998–3010 (2010)
- BLEYER, A. J., and HART, P. S.: UMOD-associated kidney disease. In: PAGON, R. A., BIRD, T. D., DOLAN, C. R., STEPHENS, K., and ADAM, M. P. (Eds.): *GeneReviews*. Seattle, WA: University of Washington 2011
- BLEYER, A. J., ZIVNA, M., and KMOCH, S.: Uromodulin-associated kidney disease. *Nephron Clin. Pract.* 118, C31–C36 (2010)
- BOLES, M. K., WILKINSON, B. M., WILLMING, L. G., LIU, B., PROBST, F. J., HARROW, J., GRAFHAM, D., HENTGES, K. E., WOODWARD, L. P., MAXWELL, A., MITCHELL, K., RISLEY, M. D., JOHNSON, R., HIRSCHI, K., LUPSKI, J. R., FUNATO, Y., MIKI, H., MARIN-GARCIA, P., MATTHEWS, L., COFFEY, A. J., PARKER, A., HUBBARD, T. J., ROGERS, J., BRADLEY, A., ADAMS, D. J., and JUSTICE, M. J.: Discovery of candidate disease genes in ENU-induced mouse mutants by large-scale sequencing, including a splice-site mutation in nucleoredoxin. *PLoS Genet.* 5, e1000759 (2009)
- FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., ADLER, T., AGUILAR-PIMENTEL, J. A., BECKER, L., CALZADA-WACK, J., DA SILVA-BUTTKUS, P., NEFF, F., GOTZ, A., HANS, W., HOLTER, S. M., HORSCH, M., KASTENMULLER, G., KEMTER, E., LENGGER, C., MAIER, H., MATLOKA, M., MOLLER, G., NATON, B., PREHN, C., PUK, O., RACZ, I., RATHKOLB, B., ROMISCH-MARGL, W., ROZMAN, J., WANG-SÄTTLER, R., SCHREWE, A., STOGER, C., TOST, M., ADAMSKI, J., AIGNER, B., BECKERS, J., BEHRENDT, H., BUSCH, D. H., ESPOSITO, I., GRAW, J., ILLIG, T., IVANDIC, B., KLINGENSPOR, M., KLOPSTOCK, T., KREMMER, E., MEMPEL, M., NESCHEN, S., OLLERT, M., SCHULZ, H., SUHRE, K., WOLF, E., WURST, W., ZIMMER, A., and HRABÉ DE ANGELIS, M.: Mouse phenotyping. *Methods* 53, 120–135 (2011)
- FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., NESCHEN, S., ADLER, T., AFONSO, L. C., AGUILAR-PIMENTEL, J. A., BECKER, L., BOHLA, A., CALZADA-WACK, J., COHRS, C., DEWERT, A., FRIDRICH, B., GARRETT, L., GLASL, L., GOTZ, A., HANS, W., HOLTER, S. M., HORSCH, M., HURT, A., JANAS, E., JANIK, D., KAHLE, M., KISTLER, M., KLEIN-RODEWALD, T., LENGGER, C., LUDWIG, T., MAIER, H., MARSCHALL, S., MICKLICH, K., MOLLER, G., NATON, B., PREHN, C., PUK, O., RACZ, I., RASS, M., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., SCHEERER, M., SCHILLER, E., SCHREWE, A., STEINKAMP, R., STOGER, C., SUN, M., SZYMCAK, W., TREISE, I., VARGAS PANESSO, I. L., VERNALEKEN, A. M., WILLERSHAUSER, M., WOLFF-MUSCATE, A., ZEH, R., ADAMSKI, J., BECKERS, J., BEKEREDJIAN, R., BUSCH, D. H., EICKELBERG, O., FAVOR, J., GRAW, J., HOFER, H., HOSCHEN, C., KATUS, H., KLINGENSPOR, M., KLOPSTOCK, T., NEFF, F., OLLERT, M., SCHULZ, H., STOGER, T., WOLF, E., WURST, W., YILDIRIM, A. O., ZIMMER, A., and HRABÉ DE ANGELIS, M.: Innovations in phenotyping of mouse models in the German Mouse Clinic. *Mamm. Genome* 23, 611–622 (2012)
- GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., ADLER, T., AGUILAR PIMENTEL, A., BECKER, L., BOLLE, I., CALZADA-WACK, J., DALKE, C., EHRHARDT, N., FERWAGNER, B., HANS, W., HOLTER, S. M., HOLZLWIMMER, G., HORSCH, M., JAVAHERI, A., KALLNIK, M., KLING, E., LENGGER, C., MORTH, C., MOSSBRUGGER, I., NATON, B., PREHN, C., PUK, O., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., SCHREWE, A., THIELE, F., ADAMSKI, J., AIGNER, B., BEHRENDT, H., BUSCH, D. H., FAVOR, J., GRAW, J., HELDMAIER, G., IVANDIC, B., KATUS, H., KLINGENSPOR, M., KLOPSTOCK, T., KREMMER, E., OLLERT, M., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., SCHULZ, H., WOLF, E., WURST, W., and HRABÉ DE ANGELIS, M.: Systemic first-line phenotyping. *Methods Mol. Biol.* 530, 463–509 (2009)

- HERBACH, N., RATHKOLB, B., KEMTER, E., PICHL, L., KLAFTEN, M., HRABÉ DE ANGELIS, M., HALBAN, P. A., WOLF, E., AIGNER, B., and WANKE, R.: Dominant-negative effects of a novel mutated *Ins2* allele causes early-onset diabetes and severe beta-cell loss in Munich *Ins2C95S* mutant mice. *Diabetes* 56, 1268–1276 (2007)
- HRABÉ DE ANGELIS, M., FLASWINKEL, H., FUCHS, H., RATHKOLB, B., SOEWARTO, D., MARSCHALL, S., HEFFNER, S., PARGENT, W., WUENSCH, K., JUNG, M., REIS, A., RICHTER, T., ALESSANDRINI, F., JAKOB, T., FUCHS, E., KOLB, H., KREMMER, E., SCHAEBLE, K., ROLLINSKI, B., ROSCHER, A., PETERS, C., MEITINGER, T., STROM, T., STECKLER, T., HOLSBOER, F., KLOPSTOCK, T., GEKELER, F., SCHINDEWOLF, C., JUNG, T., AVRAHAM, K., BEHRENDT, H., RING, J., ZIMMER, A., SCHUGHART, K., PFEFFER, K., WOLF, E., and BALLING, R.: Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nature Genet.* 25, 444–447 (2000)
- HRABÉ DE ANGELIS, M., MICHEL, D., WAGNER, S., BECKER, S., and BECKERS, J.: Chemical mutagenesis in mice. In: FOX, J. G., BARTHOLD, S. W., DAVISSON, M. T., NEWCOMER, C. E., QUIMBY, F. W., and SMITH, A. L. (Eds.): *The Mouse in Biomedical Research*. Vol. 1. History, Wild Mice, and Genetics; pp. 225–260. Burlington, MA: Academic Press 2007
- KEYS, D. A., CLARK, T. G., and FLINT, J.: Estimating the number of coding mutations in genotypic- and phenotypic-driven N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) screens. *Mamm. Genome* 17, 230–238 (2006)
- KEMTER, E., PRUECKL, P., SKLENAK, S., RATHKOLB, B., HABERMANN, F. A., HANS, W., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B., and WANKE, R.: Type of uromodulin mutation and allelic status influence onset and severity of uromodulin-associated kidney disease in mice. *Hum. Mol. Genet.* doi: 10.1093/hmg/ddt263 (2013)
- KEMTER, E., RATHKOLB, B., BANKIR, L., SCHREWE, A., HANS, W., LANDBRECHT, C., KLAFTEN, M., IVANDIC, B., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., WANKE, R., and AIGNER, B.: Mutation of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in mice is associated with severe polyuria and a urea-selective concentrating defect without hyperreninemia. *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* 298, F1405–F1415 (2010)
- KEMTER, E., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., HANS, W., SCHREWE, A., LANDBRECHT, C., KLAFTEN, M., IVANDIC, B., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., KLINGENSPOR, M., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., WANKE, R., and AIGNER, B.: Novel missense mutation of uromodulin in mice causes renal dysfunction with alterations in urea handling, energy, and bone metabolism. *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* 297, F1391–1398 (2009)
- KLEMPF, M., RATHKOLB, B., AIGNER, B., and WOLF, E.: Clinical chemical screen. In: HRABÉ DE ANGELIS, M., CHAMBON, P., and BROWN, S. (Eds.): *Standards of Mouse Model Phenotyping*; pp. 87–107. Weinheim: Wiley-VCH 2006
- LIU, M., LI, Y., CAVENER, D., and ARVAN, P.: Proinsulin disulfide maturation and misfolding in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 280, 13209–13212 (2005)
- MO, L., ZHU, X. H., HUANG, H. Y., SHAPIRO, E., HASTY, D. L., and WU, X. R.: Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated *Escherichia coli*. *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* 286, F795–F802 (2004)
- MOHR, M., KLEMPF, M., RATHKOLB, B., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., and AIGNER, B.: Hypercholesterolemia in ENU-induced mouse mutants. *J. Lipid Res.* 45, 2132–2137 (2004)
- OPPERMANN, M., MIZEL, D., HUANG, G., LI, C., DENG, C., THEILIG, F., BACHMANN, S., BRIGGS, J., SCHNERMANN, J., and CASTROP, H.: Macula densa control of renin secretion and preglomerular resistance in mice with selective deletion of the B isoform of the Na,K,2Cl co-transporter. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 17, 2143–2152 (2006)
- OPPERMANN, M., MIZEL, D., KIM, S. M., CHEN, L., FAULHABER-WALTER, R., HUANG, Y., LI, C., DENG, C., BRIGGS, J., SCHNERMANN, J., and CASTROP, H.: Renal function in mice with targeted disruption of the A isoform of the Na-K-2Cl co-transporter. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 18, 440–448 (2007)
- RATHKOLB, B., DECKER, T., FUCHS, E., SOEWARTO, D., FELLA, C., HEFFNER, S., PARGENT, W., WANKE, R., BALLING, R., HRABÉ DE ANGELIS, M., KOLB, H. J., and WOLF, E.: The clinical-chemical screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: screening for clinically relevant phenotypes. *Mamm. Genome* 11, 543–546 (2000)
- SILVER, L. M.: *Mouse Genetics: Concepts and Applications*. New York, NY: Oxford University Press 1995
- TAKAHASHI, N., CHERNAVSKY, D. R., GOMEZ, R. A., IGARASHI, P., GITELMAN, H. J., and SMITHIES, O.: Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5434–5439 (2000)
- TAKIUE, Y., HOSOYAMADA, M., YOKOO, T., KIMURA, M., OCHIAI, M., KANEKO, K., ICHIDA, K., HOSOYA, T., and SHIBASAKI, T.: Production and characterization of transgenic mice harboring mutant human *UMOD* gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27, 596–600 (2008)
- VAN BÜRCK, L., BLUTKE, A., KAUTZ, S., RATHKOLB, B., KLAFTEN, M., WAGNER, S., KEMTER, E., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B., WANKE, R., and HERBACH, N.: Phenotypic and pathomorphological characteristics of a novel mutant mouse model for maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY 2). *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E512–E523 (2010)
- VAN BÜRCK, L., SCHUSTER, M., RATHKOLB, B., SABRAUTZKI, S., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B., WANKE, R., and HERBACH, N.: Enhanced oxidative stress and endocrine pancreas alterations are linked to a novel glucokinase missense mutation in ENU-derived Munich *Gck(D217V)* mutants. *Mol. Cell. Endocrinol.* 362, 139–148 (2012)

*Bernhard Aigner*

YOSHIOKA, M., KAYO, T., IKEDA, T., and KOIZUMI, A.: A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46, 887–894 (1997)

Prof. Dr. Bernhard AIGNER  
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Moorversuchsgut  
Hackerstraße 27  
85764 Oberschleißheim  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel: +49 89 218078420  
Fax: +49 89 218078422  
E-Mail: [b.aigner@gen.vetmed.uni-muenchen.de](mailto:b.aigner@gen.vetmed.uni-muenchen.de)  
<http://www.gen.vetmed.uni-muenchen.de/index.html>

## Durch ENU-Mutagenese generierte murine Nephropathiemodelle

Rüdiger WANKE, Eckhard WOLF ML, kMA ÖAW, Bernhard AIGNER und Elisabeth KEMTER (München)

Mit 4 Abbildungen

### Zusammenfassung

Im Rahmen des Münchener ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea*)-Mausmutagenese-Projekts sind in großem Maßstab durch chemisch induzierte Zufallsmutagenese zahlreiche mutante Mauslinien generiert worden, die neuartige Tiermodelle für verschiedene Krankheiten des Menschen repräsentieren. Auf der Grundlage von Ergebnissen des klinisch-chemischen Screenings konnten unter anderem mehrere mutante Mauslinien etabliert werden, die sich durch erhöhte Harnstoffkonzentrationen im Plasma auszeichnen und daher von Interesse für die nephrologische Forschung sind. Eine dieser mutanten Linien besitzt Modellcharakter für das humane Bartter-Syndrom Typ 1. Die bei homozygoten Mutanten einer weiteren Mauslinie regelmäßig auftretenden nephropathologischen Alterationen bieten ein Modell für die renale thrombotische Mikroangiopathie. Dieser Artikel konzentriert sich auf die Beschreibung von zwei weiteren, durch erhöhte Plasmaharnstoffspiegel gekennzeichneten mutanten Mauslinien, die jeweils unterschiedliche Punktmutationen im Uromodulin (Tamm-Horsfall-Protein)-Gen (*Umod*) aufweisen. Die Resultate eingehender klinischer, klinisch-chemischer und pathomorphologischer Untersuchungen dokumentieren, dass die beiden *Umod*-mutanten Mauslinien geeignete Modelle für die Uromodulin-assoziierten Nephropathien (*Uromodulin-Associated Kidney Diseases*, UAKD) des Menschen darstellen und sich damit für weiterführende Studien zur Klärung der Pathogenese der UAKD sowie zur Erprobung neuartiger therapeutischer Ansätze anbieten.

### Abstract

In the Munich ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea*) mouse mutagenesis project numerous mutant mouse lines providing novel animal models for various human diseases have been generated on a large scale *via* chemically induced random mutagenesis. Based on results of the clinical-chemical screen several mutant mouse lines exhibiting increased plasma urea levels were established, and represent interesting models for nephrological research. One of these mutant mouse lines represents a model for the human type 1 Bartter syndrome. Kidney alterations consistently occurring in homozygous mutants of a further mouse line provide a model for renal thrombotic microangiopathy. This article focuses on two further mutant mouse lines harbouring two different point mutations in the uromodulin (Tamm-Horsfall protein) gene (*Umod*). Detailed clinical, clinical-chemical and pathomorphological analyses revealed that these *Umod*-mutant mice represent suitable models for human uromodulin-associated kidney diseases (UAKD) and, thus, may serve to clarify the pathogenesis of UAKD and to evaluate novel therapeutic approaches.

### 1. Einleitung

Im Rahmen des Münchener ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea*)-Mausmutagenese-Projekts wurden in großem Maßstab zahlreiche Mausmutanten erzeugt und damit die Aufklärung der biologischen Funktionen von Genen sowie die Generierung von neuartigen Tiermodellen für menschliche Krankheiten angestrebt (HRABÉ DE ANGELIS et al. 2000). Dem Phänotyp-basierten Ansatz des Projekts entsprechend wurde ein die Bestimmung von zahlreichen Laborparametern einschließendes klinisch-chemisches Screening durchgeführt (RATHKOLB et al. 2000). Mit dessen

Hilfe gelang es unter anderem, Mausmutanten mit erhöhten Plasmaharnstoffspiegeln zu identifizieren und schließlich mehrere, durch dieses Merkmal gekennzeichnete mutante Mauslinien zu etablieren (AIGNER et al. 2007), die zum Gegenstand eingehender Untersuchungen geworden sind. Bei einer dieser mutanten Linien konnte eine *Missense*-Mutation des für den renalen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter NKCC2 kodierenden *Slc12a1* (*Solute Carrier Family 12 Member 1*)-Gens als ursächlich für den Phänotyp identifiziert werden, und der Modellcharakter für das menschliche Bartter-Syndrom Typ 1 wurde unter vergleichenden Aspekten detailliert dargelegt (KEMTER et al. 2010).

Eine weitere mutante Mauslinie zeichnet sich durch eine Mutation in einem funktionell bislang noch nicht charakterisierten Gen aus. Bei homozygoten Trägern dieser Mutation entwickelt sich eine rasch fortschreitende Nephropathie, die Modellcharakter für die renale thrombotische Mikroangiopathie (TMA, BARBOUR et al. 2012) besitzt (AIGNER et al. 2007). Die bei den homozygoten Mutationsträgern dieser Mauslinie auftretenden pathomorphologischen Alterationen betreffen initial selektiv die Glomerula, weshalb diese Mausmutanten als hervorragend geeignetes Modell für die Entschlüsselung der an der Glomerulumschädigung bei TMA beteiligten molekularen Mechanismen erachtet werden. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf zwei weitere mutante Mauslinien mit erhöhten Plasmaharnstoffkonzentrationen, bei denen die kausale Mutation identifiziert werden konnte und der daraus resultierende Phänotyp bereits so weit charakterisiert worden ist, dass Aussagen über deren Eignung als Modelle für korrespondierende menschliche Krankheiten getroffen werden können.

## 2. Mausmutanten mit Modellcharakter für die Uromodulin-assoziierten Nephropathien

Igor TAMM und Frank HORSFALL berichteten im Jahre 1950 über ein aus humanem Urin isoliertes, die virusbedingte Hämagglutination hemmendes Mukoprotein (TAMM und HORSFALL 1950), welches nach diesen beiden Virologen benannt und als Tamm-Horsfall-Protein bekannt wurde. 35 Jahre später beschrieben MUCHMORE und DECKER ein aus dem Urin schwangerer Frauen isoliertes Glykoprotein, für das *in vitro* inhibitorische Effekte auf Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen werden konnten. Aufgrund seines Ursprungs und seiner immunmodulatorischen Eigenschaften wurde für dieses Glykoprotein die Bezeichnung „Uromodulin“ gewählt (MUCHMORE und DECKER 1985). Wenige Jahre später konnte mittels molekularbiologischer Methoden gezeigt werden, dass Tamm-Horsfall-Protein und Uromodulin identisch sind (PENNICA et al. 1987).

Uromodulin wird ausschließlich in der Niere von den Epithelzellen des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife (*Thick Ascending Limb of the Loop of Henle*, TALH) produziert und stellt bei Säugetieren das mengenmäßig vorherrschende Harnprotein dar. Die Biosynthese von Uromodulin ist komplex und umfasst zunächst die Bildung eines Vorläuferproteins, welches in das endoplasmatische Retikulum (ER) importiert wird. Dort erfolgen die Abspaltung der für die Aufnahme in das ER notwendigen Signalsequenz, die Verknüpfung mit dem GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Anker und die ersten Glykosilierungen. Nach weiterer Glykosilierung und Modifikation der Glykanketten im Golgi-Apparat gelangt das noch nicht polymerisationsfähige Uromodulin zur luminalen Zellmembran, wird dort *via* GPI verankert und schließlich nach Abspaltung der hydrophoben Peptidketten in das Tubuluslumen freigesetzt (RAMPOLDI et al. 2011). Das in das Tubuluslumen abgegebene Uromodulin enthält



neueren Studien zufolge 563 Aminosäuren (VYLETAL et al. 2010), darunter 48 Cysteinreste, die 24 Disulfidbrücken bilden können, und weist einen hohen Kohlenhydratanteil auf, der etwa 30 % der Molekularmasse von ca. 80–90 kDa ausmacht. Im Urin liegt Uromodulin vorwiegend als makromolekulares Polymer ( $10^6$ – $10^7$  Da) vor (SERAFINI-CESSI et al. 2003, RAMPOLDI et al. 2011).

Die biologischen Funktionen von Uromodulin sind bislang nur unzureichend geklärt. Postuliert werden unter anderem eine Schutzfunktion von Uromodulin gegenüber aufsteigenden Harnwegsinfekten und der Entwicklung einer Urolithiasis sowie eine Beteiligung von Uromodulin am Ionen-transport im TALH und dem Harnkonzentrierungsmechanismus (Übersichten bei BLEYER et al. 2011, RAMPOLDI et al. 2011). Ein verstärktes Interesse an Uromodulin wurde durch in der letzten Dekade publizierte Studien ausgelöst, in denen Mutationen des Uromodulin-Gens (*UMOD*) als ursächlich für bestimmte, autosomal-dominant vererbte Nierenkrankheiten des Menschen identifiziert wurden (HART et al. 2002, RAMPOLDI et al. 2003). Unter dem Oberbegriff „Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen“ (*Uromodulin-Associated Kidney Diseases*, UAKD) subsummiert werden die medulläre zystische Nierenerkrankung Typ 2 (*Medullary Cystic Kidney Disease Type 2*, MCKD2, OMIM #603860), die familiäre juvenile hyperurikämische Nephropathie (*Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy*, FJHN, OMIM #162000) sowie die autosomal dominante glomerulozystische Nephropathie (*autosomal dominant Glomerulocystic Kidney Disease*, GCKD, OMIM #609886) (LENS et al. 2005). Beim Menschen wurden bislang mehr als 70 unterschiedliche, UAKD verursachende *UMOD*-Mutationen beschrieben (KEMTER et al. 2013 und dortige Referenzen). Das klinische Bild der UAKD ist heterogen. Hinweisend auf eine UAKD können sein: Eine bereits im Kindesalter auftretende Hyperurikämie und die Entwicklung einer Gicht in einem ungewöhnlich frühen Lebensalter ohne vorliegende fortgeschrittene renale Insuffizienz, Anzeichen einer leichten Harnkonzentrierungsstörung mit daraus eventuell resultierender Polyurie, eine langsam fortschreitende Funktionsverschlechterung der Nieren bei minimaler oder fehlender Proteinurie sowie eine positive Familienanamnese (NASR et al. 2008, BLEYER et al. 2011, RAMPOLDI et al. 2011).

Die Auswertung publizierter Daten von mehr als 200 UAKD-Patienten ergab, dass etwa 70 % dieser Patienten an einem chronischen Nierenversagen litten. Hinsichtlich der Häufigkeit einer Hyperurikämie mit Gicht wurde ein vergleichbar hoher Prozentsatz ermittelt (SCOLARI et al. 2004). Die Geschwindigkeit der Progression des chronischen Nierenversagens ist bei UAKD-Patienten und selbst bei Mitgliedern derselben Familie sehr unterschiedlich. So ergab eine mehr als 100 UAKD-Patienten berücksichtigende Studie bei über 40 % der Patienten ein terminales Nierenversagen in einem Alter von 25 bis über 70 Jahren (BOLLÉE et al. 2011). Die morphologischen Aspekte der UAKD umfassen eine tubulointerstitielle Fibrose und entzündliche Zellinfiltrate sowie eine Tubulusatrophie. Die ursprünglich namensgebenden zystischen Alterationen der Niere werden inzwischen nicht mehr als vordergründig gesehen (NASR et al. 2008, RAMPOLDI et al. 2011). Eine spezifische Therapie der UAKD ist bislang nicht verfügbar. Als symptomatische Therapie wird zur Vermeidung respektive Behandlung der Gicht die Gabe von Allopurinol empfohlen (BLEYER et al. 2011).

Bezüglich der Pathogenese der UAKD sowie etwaiger therapeutischer Strategien bestehen zahlreiche offene Fragen, zu deren Klärung Studien an geeigneten Tiermodellen einen entscheidenden Beitrag leisten können. Vor diesem Hintergrund wurden zwei, unterschiedliche Mutationen des Uromodulin-Gens (*Umod*) aufweisende Mauslinien eingehend untersucht, die im Rahmen des Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekts auf dem genetischen Hintergrund

des Inzuchtstammes C3H etabliert worden sind. Die bei einer dieser Linien identifizierte Punktmutation des *Umod*-Gens führt zur Substitution der Aminosäure Alanin durch Threonin an Position 227 des Uromodulin-Proteins (*Umod*<sup>A227T</sup>). Diese Punktmutation liegt in einer speziübergreifend hochkonservierten Region, in der auch beim Menschen mehrere *UMOD*-Mutationen detektiert wurden (KEMTER et al. 2009). Bei der zweiten Mauslinie liegt eine *Umod*-Punktmutation vor, die zu einem Austausch von Cystein gegen Phenylalanin an der Aminosäureposition 93 des Uromodulins führt (*Umod*<sup>C93F</sup>). Dies bedingt, dass eine der Disulfidbrücken (C93–C105) des Uromodulinmoleküls nicht mehr gebildet werden kann. Bei Patienten mit UAKD wurde eine hinsichtlich der betroffenen Disulfidbrücke korrespondierende *UMOD*-Mutation identifiziert (KEMTER et al. 2013, ZAUCKE et al. 2010).

Klinisch-chemische Untersuchungen ergaben einen altersabhängig fortschreitenden Anstieg der Plasmaharnstoffkonzentrationen bei beiden *Umod*-mutanten Mauslinien. Homozygote *Umod*<sup>C93F</sup>-mutante Mäuse wiesen im Vergleich zu jeweils altersgleichen Wildtyp-Kontrolltieren bereits im Alter von zwei Wochen signifikant erhöhte und im Alter von drei Monaten im Durchschnitt um den Faktor 3 höhere Harnstoffspiegel auf. Bei heterozygoten *Umod*<sup>C93F</sup>-mutanten Mäusen war eine Erhöhung dieses Parameters erst ab der 7. Lebenswoche (weibliche Tiere) respektive dem 3. Lebensmonat (männliche Tiere) feststellbar. Die Harnstoffspiegel homozygoter *Umod*<sup>A227T</sup>-mutanter Mäuse unterschieden sich im Alter von zwei Wochen nicht von denen der Kontrolltiere und waren gegenüber diesen ab der 7. Lebenswoche signifikant erhöht. Bei heterozygoten *Umod*<sup>A227T</sup>-mutanten Mäusen waren gegenüber Kontrollen signifikant höhere Harnstoffspiegel erst ab dem 4. Lebensmonat nachweisbar.

Als weiterer Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion diente die Cystatin C-Konzentration im Plasma. Homozygote Mutanten beider Linien zeigten bereits im Alter von vier Monaten signifikant höhere Cystatin C-Spiegel als die Kontrolltiere. Diese Unterschiede waren im Alter von 20 Monaten noch erheblich deutlicher ausgeprägt, wobei homozygote *Umod*<sup>C93F</sup>-Mutanten signifikant höhere Cystatin C-Konzentrationen im Plasma aufwiesen als homozygote *Umod*<sup>A227T</sup>-Mutanten. Diese Befunde belegen die Entwicklung einer renalen Insuffizienz und deren altersabhängige Progression bei beiden *Umod*-mutanten Mauslinien. Sowohl die Art der Mutation als auch der allele Status des Tieres beeinflussten den Schweregrad der Nierenfunktionsstörung. *Umod*-Mutanten beider Mauslinien zeichneten sich gegenüber den Kontrolltieren aus durch gesteigerten Trinkwasserkonsum, gesteigertes tägliches Harnvolumen sowie Hypoosmolalität des ausgeschiedenen Urins (KEMTER et al. 2009, 2013). Diese Befunde stehen in Einklang mit der für die UAKD des Menschen beschriebenen milden Harnkonzentrierungsstörung (BLEYER et al. 2011). Ferner fanden sich bei den *Umod*-mutanten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant reduzierte fraktionelle Exkretion von Harnsäure sowie ein hochgradig verminderter Uromodulingehalt im Urin und damit ebenfalls eine Übereinstimmung mit Untersuchungsergebnissen menschlicher UAKD-Patienten. Eine Reduktion der Uromodulinausscheidung im Urin stellt allerdings keinen für die UAKD spezifischen Befund dar (VYLETAL et al. 2010).

Eingehende morphologische Untersuchungen der Nieren erfolgten bei hetero- und homozygoten *Umod*<sup>A227T</sup>- sowie *Umod*<sup>C93F</sup>-mutanten Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren unterschiedlicher Altersstufen. Zu den bei den *Umod*-Mutanten bereits früh zu erhebenden morphologischen Befunden gehörten intrazytoplasmatische, in der Trichromfärbung nach MASSON graublau bis mittelblau tingierende Inklusionen in Epithelzellen des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife (TALH) (Abb. 1).

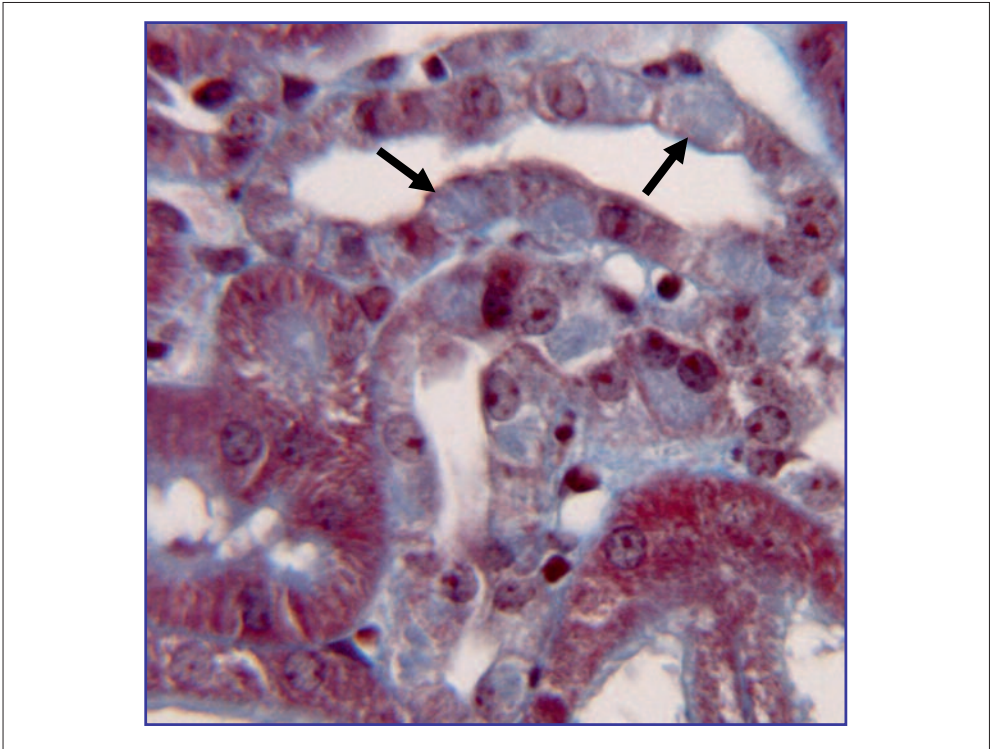


Abb. 1 Intrazytoplasmatische Inklusionen (davon einzelne durch Pfeile markiert) in Epithelzellen des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife, heterozygote *Umod*<sup>C93F</sup>-mutante Maus, männlich, Alter 3 Monate, Trichromfärbung nach MASSON.

Elektronenoptisch erwiesen sich diese Inklusionen als hochgradig hyperplastisches endoplasmatisches Retikulum (Abb. 2).

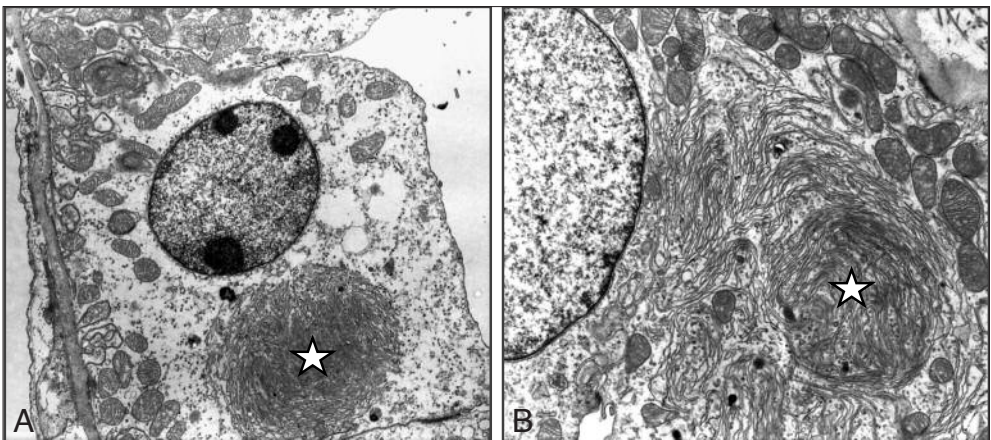


Abb. 2 Epithelzellen des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife mit hyperplastischem endoplasmatischem Retikulum (durch Sterne markiert), homozygote *Umod*<sup>A227T</sup>-mutante Maus, männlich, Alter 20 Monate, transmissionselektronenmikroskopische Übersicht (A) und Detailaufnahme (B).



Die immunhistochemische Darstellung von Uromodulin in Nieren von Wildtyp-Kontrolltieren ergab eine zytoplasmatische und an der luminalen Membran deutlich akzentuierte Markierung der TALH-Zellen. Im Unterschied dazu ergab der immunhistochemische Nachweis von Uromodulin in Nieren *Umod*-mutanter Tiere eine intensive zytoplasmatische, teils grobschollige und bevorzugt perinukleäre Markierung der TALH-Zellen bei fehlender oder nur dezent ausgeprägter Markierung der apikalen Zellmembran (Abb. 3). Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde das endoplasmatische Retikulum als Lokalisation des akkumulierten Uromodulins nachgewiesen (KEMTER et al. 2013). Qualitativ gleichartige histologische, immunhistochemische und elektronenmikroskopische renale Befunde sind bei menschlichen UAKD-Patienten erhoben worden (DEVUYST et al. 2005, NASR et al. 2008).

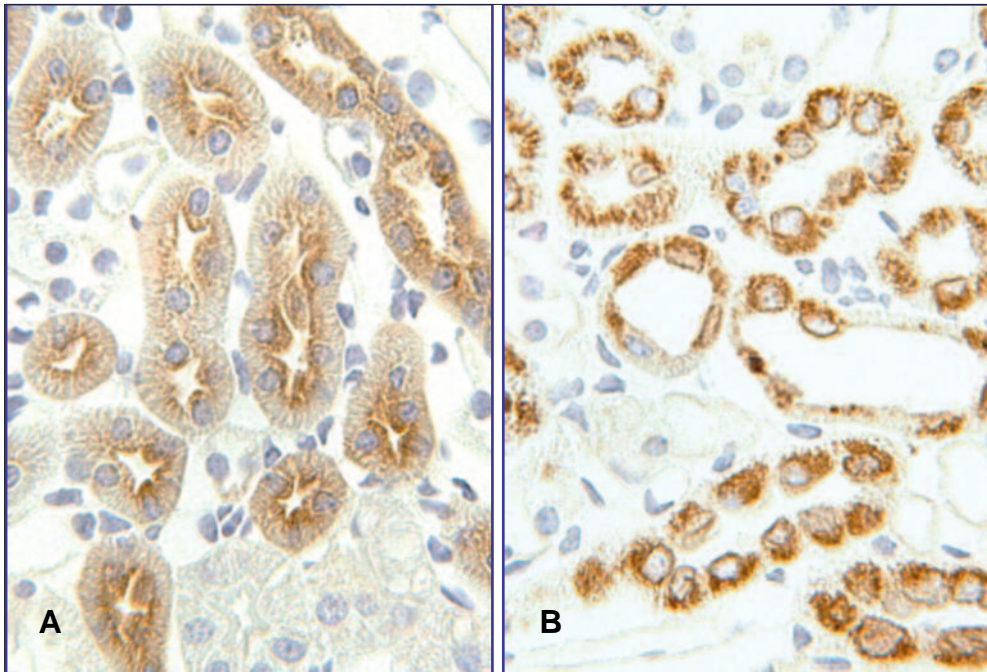


Abb. 3 Immunhistochemische Darstellung von Uromodulin: Diffuse zytoplasmatische und an der luminalen Zellmembran akzentuierte Markierung der Epithelzellen des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife (TALH) bei einem Wildtypkontrolltier (A), männlich, Alter 3 Monate. Intensive, granuläre bis grobschollige zytoplasmatische und insbesondere perinukleäre Markierung der TALH-Zellen bei einer homozygoten *Umod*<sup>A227T</sup>-mutanten Maus (B), männlich, Alter 3 Monate. Indirektes Immunperoxidase-Verfahren mit DAB als Chromogen.

Unter pathogenetischen Gesichtspunkten sind zwei Effekte der Mutation des Uromodulin-Gens als entscheidend für die Entwicklung einer UAKD in Betracht gezogen worden: Zum einen der mit dem Schwund von korrekt gefaltetem Uromodulin an der apikalen Membran der TALH-Zellen einhergehende Verlust der potenziellen Funktionen von Uromodulin mit einer daraus resultierenden Beeinträchtigung des Harnkonzentrationsvermögens und kompensatorisch gesteigerter Reabsorption von Harnsäure im proximalen Tubulus. Zum anderen eine aufgrund der veränderten Tertiärstruktur gestörte Prozessierung und dadurch bedingte Akkumulation des mutierten Uromodulins im endoplasmatischen Retikulum (ER) mit resul-

tierender Schädigung und gegebenenfalls dem Untergang von TALH-Zellen *via* ER-Stress-bedingter Apoptose (BLEYER et al. 2011).

Das Spektrum der bei den *Umod*-mutanten Tieren auftretenden nephropathologischen Alterationen umfasst eine interstitielle Fibrose, Tubulusatrophie und entzündliche Zellinfiltrate im Interstitium (Abb. 4). Diese Veränderungen konnten bei 20–22 Monate alten *Umod*-Mutanten beider Linien regelmäßig nachgewiesen werden und wurden bei einem Teil dieser Tiere durch glomerulosklerotische sowie glomerulo- und tubulozystische Alterationen ergänzt. Der Schweregrad der vordergründigen renalen Veränderungen (interstitielle Fibrose, Tubulusatrophie, Entzündungszellinfiltrate) wurde durch quantitativ-stereologische Untersuchungen objektiv erfasst und zeigte eine Abhängigkeit vom Alter, dem Genotyp und dem Allelstatus.

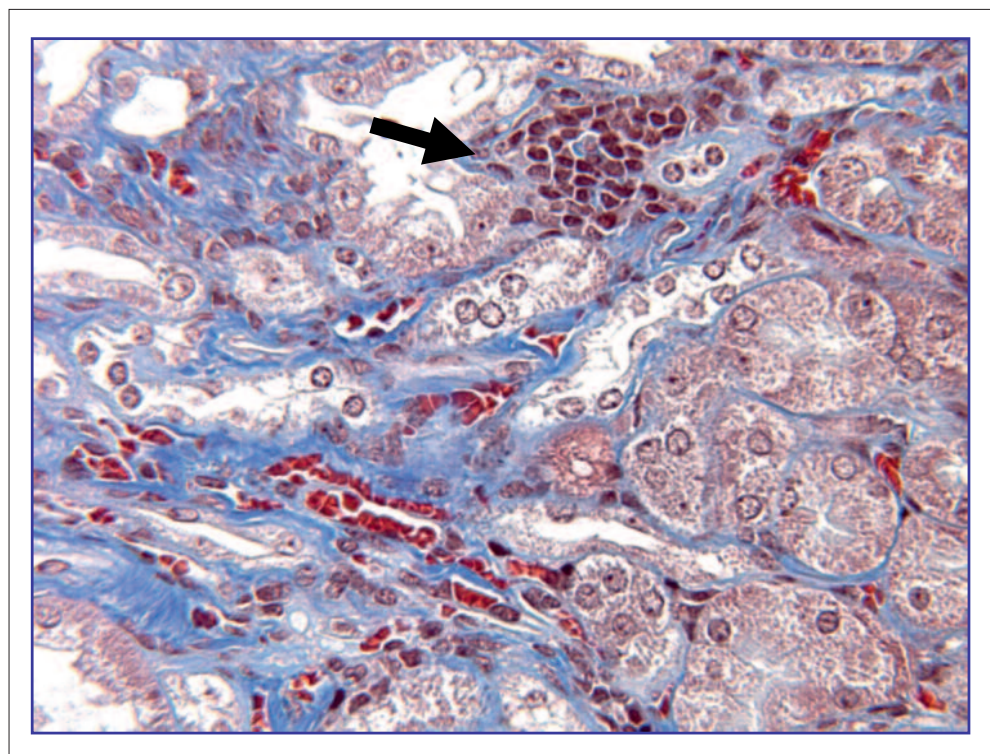


Abb. 4 Tubulointerstitielle Fibrose und fokales Infiltrat mononukleärer Entzündungszellen (Pfeil), homozygote *Umod*<sup>C93F</sup>-mutante Maus, männlich, Alter 20 Monate, Trichromfärbung nach MASSON.

Der Verlauf der UAKD des Menschen ist individuell sehr unterschiedlich, wobei die hierfür verantwortlichen Ursachen bislang ungeklärt sind. In einer 37 UAKD-verursachende *UMOD*-Mutationen berücksichtigenden Studie konnte keine Beziehung zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens und der Geschwindigkeit der Progression der Nephropathie ermittelt werden (BOLLÉE et al. 2011). Mit den im Rahmen der Analyse der beiden *Umod*-mutanten Mauslinien erzielten Ergebnissen konnte erstmals *in vivo* ein Zusammenhang zwischen Entwicklungszeitpunkt sowie Progressionsgeschwindigkeit der renalen Alterationen und der Art der *Umod*-Mutation sowie dem Allelstatus aufgezeigt werden (KEMTER et al. 2013). Bei vergleichender

Betrachtung sind große Ähnlichkeiten zwischen den bei *Umod*<sup>A227T</sup>- sowie *Umod*<sup>C93F</sup>-mutanten Mäusen und den bei menschlichen UAKD-Patienten erhobenen Befunden festzustellen. Für die bei den menschlichen Patienten häufig auftretende Hyperurikämie mit Gicht bieten die murinen *Umod*-Mutanten allerdings kein Pendant. Dieser Unterschied kann mit der bei der Maus gegebenen und beim Menschen fehlenden Urikase (Uratoxidase)-Aktivität erklärt werden.

Während die Generierung der beiden hier betrachteten *Umod*-mutanten Mauslinien auf einer chemisch induzierten Zufallsmutagenese beruht, wurden mittels transgener Technologie gezielt genetisch modifizierte Mäuse zum Zwecke der Generierung muriner UAKD-Modelle erzeugt. So wurde durch additiven Gentransfer eine transgene Mauslinie erstellt, bei der, neben der Expression des endogenen *Umod*-Gens, die Expression einer mutanten Form des menschlichen *UMOD*-Gens unter der transkriptionellen Kontrolle des murinen *Umod*-Promotors erfolgt. Dabei wurde eine beim Menschen bekanntermaßen UAKD verursachende *UMOD*-Mutation (C148W) gewählt. Die *UMOD*<sup>C148W</sup>-transgenen Tiere wiesen zwar eine Anreicherung von Uromodulin in TALH-Zellen auf, entwickelten jedoch keine Alterationen, die sie als Modell für die UAKD des Menschen auszeichnen würden (TAKIUE et al. 2008a, b, VY-LETAL et al. 2010).

Bei einer weiteren, ebenfalls durch additiven Gentransfer generierten transgenen Mauslinie erfolgt die Expression einer der menschlichen *UMOD*<sup>C148W</sup>-Mutation entsprechenden mutanten Form des murinen *Umod*-Gens (C147W). Zu den bei *Umod*<sup>C147W</sup>-transgenen Mäusen erhobenen Befunden gehören Anzeichen einer Harnkonzentrierungsstörung, eine drastisch reduzierte Ausscheidung sowohl des Transgen-codierten wie des endogenen Uromodulins, TALH-Zellen mit Akkumulation von Uromodulin und ER-Hyperplasie sowie die Entwicklung einer mit Erhöhung der Plasmaharnstoffspiegel einhergehenden progressiven Nephropathie mit tubulointerstitieller Fibrose, entzündlichen Zellinfiltraten, Tubulusatrophie und tubulozystischen Veränderungen. *Umod*<sup>C147W</sup>-transgene Mäuse rekapitulieren damit zahlreiche Aspekte der humanen UAKD. Bemerkenswerterweise fanden sich bei diesen transgenen Mäusen tubulonekrotische Veränderungen, wohingegen ein durch Apoptose bedingter Untergang von Tubulusepithelzellen nicht nachgewiesen werden konnte (BERNASCONE et al. 2010, RAMPOLDI et al. 2011).

### 3. Schlussfolgerung

In der Gesamtschau ist festzustellen, dass die im Rahmen des Münchener ENU-Mausmutagenese-Projekts unter Verwendung der Plasmaharnstoffspiegel als Screeningparameter etablierten mutanten Mauslinien geeignete Modelle für verschiedene seltene und bislang unzureichend erforschte Nierenkrankheiten des Menschen darstellen. Diese neuartigen murinen Nephropathiemodelle können und sollten genutzt werden, um zu einem besseren Verständnis der Pathogenese dieser Krankheiten zu gelangen und bieten sich an zur Überprüfung therapeutischer Ansätze.

#### Dank

Die Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Genetik (Prof. Dr. Martin HRABÉ DE ANGELIS) am Helmholtz-Zentrum München und der dortigen „German Mouse Clinic“. Allen beteiligten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern dieser Einrichtungen sei an dieser Stelle gedankt.

Literatur

- AIGNER, B., RATHKOLB, B., HERBACH, N., KEMTER, E., SCHESSL, C., KLAFTEN, M., KLEMP, M., HRABÉ DE ANGELIS, M. H., WANKE, R., and WOLF, E.: Screening for increased plasma urea levels in a large-scale ENU mouse mutagenesis project reveals kidney disease models. *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* 292, 1560–1567 (2007)
- BARBOUR, T., JOHNSON, S., COHNEY, S., and HUGHES, P.: Thrombotic microangiopathy and associated renal disorders. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, 2673–2685 (2012)
- BERNASCONE, I., JANAS, S., IKEHATA, M., TRUDU, M., CORBELL, A., SCHAEFFER, C., RASTALDI, M. P., DEVUYST, O., and RAMPOLDI, L.: A transgenic mouse model for uromodulin-associated kidney diseases shows specific tubulo-interstitial damage, urinary concentrating defect and renal failure. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2998–3010 (2010)
- BLEYER, A. J., ZIVNÁ, M., and KMOCH, S.: Uromodulin-associated kidney disease. *Nephron Clin. Pract.* 118, c31–36 (2011)
- BOLLÉE, G., DAHAN, K., FLAMANT, M., MORINIÈRE, V., PAWTOWSKI, A., HEIDET, L., LACOMBE, D., DEVUYST, O., PIRSON, Y., ANTIGNAC, C., and KNEBELMANN, B.: Phenotype and outcome in hereditary tubulointerstitial nephritis secondary to UMOD mutations. *Clin. J. Amer. Soc. Nephrol.* 6, 2429–2438 (2011)
- DEVUYST, O., DAHAN, K., and PIRSON, Y.: Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20, 1290–1294 (2005)
- HART, T. C., GORRY, M. C., HART, P. S., WOODARD, A. S., SHIHABI, Z., SANDHU, J., SHIRTS, B., XU, L., ZHU, H., BARMADA, M. M., and BLEYER, A. J.: Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J. Med. Genet.* 39, 882–892 (2002)
- HRABÉ DE ANGELIS, M. H., FLASWINKEL, H., FUCHS, H., RATHKOLB, B., SOEWARTO, D., MARSCHALL, S., HEFFNER, S., PARGENT, W., WUENSCH, K., JUNG, M., REIS, A., RICHTER, T., ALESSANDRINI, F., JAKOB, T., FUCHS, E., KOLB, H., KREMMER, E., SCHAEBLE, K., ROLLINSKI, B., ROSCHER, A., PETERS, C., METTINGER, T., STROM, T., STECKLER, T., HOLSBOER, F., KLOPSTOCK, T., GEKELER, F., SCHINDEWOLF, C., JUNG, T., AVRAHAM, K., BEHRENDT, H., RING, J., ZIMMER, A., SCHUGHART, K., PFEFFER, K., WOLF, E., and BALLING, R.: Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nature Genet.* 25, 444–447 (2000)
- KEMTER, E., PRUECKL, P., SKLENAK, S., RATHKOLB, B., HABERMANN, F. A., HANS, W., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B., and WANKE, R.: Type of uromodulin mutation and allelic status influence onset and severity of uromodulin-associated kidney disease in mice. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4148–4163 (2013)
- KEMTER, E., RATHKOLB, B., BANKIR, L., SCHREWE, A., HANS, W., LANDBRECHT, C., KLAFTEN, M., IVANDIC, B., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., WANKE, R., and AIGNER, B.: Mutation of the Na(+)-K(+)2Cl(-) cotransporter NKCC2 in mice is associated with severe polyuria and a urea-selective concentrating defect without hyperreninemia. *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* 298, F1405–F1415 (2010)
- KEMTER, E., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., HANS, W., SCHREWE, A., LANDBRECHT, C., KLAFTEN, M., IVANDIC, B., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., KLINGENSPOR, M., HRABÉ DE ANGELIS, M., WOLF, E., WANKE, R., and AIGNER, B.: Novel missense mutation of uromodulin in mice causes renal dysfunction with alterations in urea handling, energy, and bone metabolism. *Amer. J. Physiol. Renal. Physiol.* 297, F1391–F1398 (2009)
- LENS, X. M., BANET, J. F., OUTED, P., and BARRIO-LUCÍA, V.: A novel pattern of mutation in uromodulin disorders: autosomal dominant medullary cystic kidney disease type 2, familial juvenile hyperuricemic nephropathy, and autosomal dominant glomerulocystic kidney disease. *Amer. J. Kidney Dis.* 46, 52–57 (2005)
- MUCHMORE, A. V., and DECKER, J. M.: Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women. *Science* 229, 479–481 (1985)
- NASR, S. H., LUCIA, J. P., GALGANO, S. J., MARKOWITZ, G. S., and D'AGATI, V. D.: Uromodulin storage disease. *Kidney Int.* 73, 971–976 (2008)
- PENNICA, D., KOHR, W. J., KUANG, W. J., GLAISTER, D., AGGARWAL, B. B., CHEN, E. Y., and GOEDDEL, D. V.: Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. *Science* 236, 83–88 (1987)
- RAMPOLDI, L., CARIDI, G., SANTON, D., BOARETTO, F., BERNASCONE, I., LAMORTE, G., TARDANICO, R., DAGNINO, M., COLUSSI, G., SCOLARI, F., GHIGGERI, G. M., AMOROSO, A., and CASARI, G.: Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3369–3384 (2003)
- RAMPOLDI, L., SCOLARI, F., AMOROSO, A., GHIGGERI, G., and DEVUYST, O.: The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 80, 338–347 (2011)
- RATHKOLB, B., DECKER, T., FUCHS, E., SOEWARTO, D., FELLA, C., HEFFNER, S., PARGENT, W., WANKE, R., BALLING, R., HRABÉ DE ANGELIS, M., KOLB, H. J., and WOLF, E.: The clinical-chemical screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: screening for clinically relevant phenotypes. *Mamm. Genome* 11, 543–546 (2000)



- SCOLARI, F., CARIDI, G., RAMPOLDI, L., TARDANICO, R., IZZI, C., PIRULLI, D., AMOROSO, A., TARDANICO, R., CASARI, G., and GHIGGERI, G. M.: Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms. *Amer. J. Kidney Dis.* 44, 987–999 (2004)
- SERAFINI-CESSI, F., MALAGOLINI, N., and CAVALLONE, D.: Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Amer. J. Kidney Dis.* 42, 658–676 (2003)
- TAKIUE, Y., HOSOYAMADA, M., YOKOO, T., KIMURA, M., OCHIAI, M., KANEKO, K., ICHIDA, K., HOSOYA, T., and SHIBASAKI, T.: Production and characterization of transgenic mice harboring mutant human UMOD gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27, 596–600 (2008a)
- TAKIUE, Y., HOSOYAMADA, M., YOKOO, T., KIMURA, M., and SHIBASAKI, T.: Progressive accumulation of intrinsic mouse uromodulin in the kidneys of transgenic mice harboring the mutant human uromodulin gene. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 405–411 (2008b)
- TAMM, I., and HORSFALL, F. L.: Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74, 106–108 (1950)
- VYLETAL, P., BLEYER, A. J., and KMOCH, S.: Uromodulin biology and pathophysiology—an update. *Kidney Blood Press. Res.* 33, 456–475 (2010)
- ZAUCKE, F., BOEHNLEIN, J. M., STEFFENS, S., POLISHCHUK, R. S., RAMPOLDI, L., FISCHER, A., PASCH, A., BOEHM, C. W., BAASNER, A., ATTANASIO, M., HOPPE, B., HOPFER, H., BECK, B. B., SAYER, J. A., HILDEBRANDT, F., and WOLF, M. T.: Uromodulin is expressed in renal primary cilia and UMOD mutations result in decreased ciliary uromodulin expression. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1985–1997 (2010)

Prof. Dr. Rüdiger WANKE  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Institut für Tierpathologie  
Veterinärstraße 13  
80539 München  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 89 21802854  
Fax: +49 89 21802544  
E-Mail: wanke@patho.vetmed.uni-muenchen.de

## Maßgeschneiderte Schweinemodelle für monogene Erbkrankheiten des Menschen

Eckhard WOLF ML, kMA ÖAW,<sup>1</sup> Katinka BURKHARDT,<sup>1</sup> Andreas BLUTKE,<sup>2</sup> Sabine KRAUSE,<sup>3</sup> Annegret WUENSCH,<sup>1</sup> Barbara KESSLER,<sup>1</sup> Valeri ZAKHARTCHENKO,<sup>1</sup> Mayuko KUROME,<sup>1</sup> Elisabeth KEMTER,<sup>1</sup> Rüdiger WANKE,<sup>2</sup> Hanns LOCHMÜLLER,<sup>4</sup> Maggie C. WALTER<sup>3</sup> und Nikolai KLYMIUK<sup>1</sup>

Mit 2 Abbildungen

### Zusammenfassung

Schweinemodelle eignen sich in besonderem Maße für die translationale biomedizinische Forschung, da sie dem Menschen in vielen anatomischen und physiologischen Charakteristika ähnlich sind. Durch effiziente Methoden der gezielten genetischen Modifikation ist es möglich, die Ursachen menschlicher Erkrankungen im Modelltier Schwein auf molekularer Ebene zu reproduzieren. Solche gezielt für bestimmte Fragestellungen konzipierten Modelle lassen im Vergleich zu konventionellen Tiermodellen Ergebnisse höherer Aussagekraft erwarten und entsprechen in hohem Maße dem dritten ‚R‘ der ‚3R‘-Maxime tierexperimenteller Forschung (*Replace, Reduce, Refine*). Dies wird am Beispiel eines neuen Schweinmodells für die Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) erläutert. DMD wird durch Mutationen im X-chromosomalen Dystrophin (*DMD*)-Gen verursacht, die in einer meist vollständigen Abwesenheit des essentiellen Muskelproteins Dystrophin resultieren. Dies führt zur Degeneration von Muskelzellen, zu progressiver Muskelschwäche und schließlich zum Tod meist in der dritten bis vierten Lebensdekade. Derzeit verfügbare Dystrophin-defiziente Maus- und Hundemodelle unterscheiden sich im klinischen bzw. pathologischen Phänotyp sowie in der Art der *Dmd/DMD*-Mutationen von den bei DMD-Patienten am häufigsten vorkommenden Veränderungen. Daher haben wir Schweine generiert, in denen Exon 52 des *DMD*-Gens deletiert ist. Dieses Modell spiegelt eine häufige *DMD*-Mutation beim Menschen wider und sollte für die Erprobung zielgerichteter Therapien, wie Exon-Skipping zur Herstellung eines intakten Leserahmens, geeignet sein. Die Analyse des *DMD*-Schweinmodells zeigte wichtige biochemische, klinische und pathologische Übereinstimmungen mit der humanen DMD. Es ist somit gelungen, ein vielversprechendes neues Tiermodell für Pathogenesestudien sowie für die Entwicklung und Evaluierung zielgerichteter Therapien der Duchenne-Muskeldystrophie zu etablieren.

### Abstract

Pigs are particularly suitable animal models for translational biomedical research as they reflect many anatomical and physiological characteristics of humans. Efficient methods for targeted genetic modification of pigs allow reproducing the causes of human genetic diseases at the molecular level. Such large animal models, genetically tailored for addressing specific scientific problems, should yield more relevant results as compared to conventional animal models. Thus, genetically engineered pig models are highly compatible with the third ‘R’ of the ‘3R’ rule (*Replace, Reduce, Refine*) of ethical animal experimentation. This is exemplified by a new pig model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). DMD is caused by mutations in the X-linked dystrophin (*DMD*) gene. The absence of the essential muscle protein dystrophin leads to degeneration of muscle fibres, progressive muscle weakness and wasting, disability

1 Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum und Veterinärwissenschaftliches Department, Ludwig-Maximilians-Universität München.

2 Institut für Tierpathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.

3 Friedrich-Baur-Institut, Neurologische Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München.

4 Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK.

and death in the third to fourth decade of life. Currently available dystrophin-deficient mouse and dog models differ in their clinical/pathological phenotype and/or in the type of *Dmd/DMD* mutation from the most frequently occurring alterations in DMD patients. Therefore, we generated pigs in which exon 52 of the *DMD* gene is deleted. This animal model reflects a frequent mutation of human DMD patients and should be suitable for testing targeted therapies such as exon skipping to restore an intact reading frame. The analysis of DMD pigs revealed biochemical, clinical, and pathological resemblance of the human disease. Thus, we established a promising large animal model for studying disease mechanisms and for the development and evaluation of targeted therapies of Duchenne muscular dystrophy.

## 1. Einleitung

Die Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) ist eine schwere X-chromosomal vererbte Erkrankung, die etwa einen von 3500 Buben betrifft. DMD entsteht durch Mutationen im *DMD*-Gen, das mit einer Gesamtlänge von ca. 2,5 Mega-Basenpaaren und 79 Exons das größte bekannte Gen des Menschen ist (HOFFMAN et al. 1987). Die meisten Mutationen treten im Bereich der Exons 3–7 und der Exons 45–55 auf (KOENIG et al. 1989). Charakteristisch sind Mutationen, die zu einer Verschiebung des Leserahmens und zum Verlust des essentiellen Muskelproteins Dystrophin führen. Dystrophin verbindet über einen Komplex Dystrophin-assoziiierter Proteine das Aktinzytoskelett mit der extrazellulären Matrix. Wenn Dystrophin fehlt, kommt es zur Degeneration der Muskelzellen, zu einer progressiven Muskelschwäche und einem Verlust von Muskelgewebe. Die Patienten zeigen erste Symptome, bevor sie 5 Jahre alt werden, verlieren die Fähigkeit zu gehen etwa im Alter von 12 Jahren, und sterben aufgrund von Atem- und/oder Herzversagen in der Regel in der dritten bis vierten Lebensdekade (SPURNEY 2011).

Zum Verständnis der DMD-Pathogenese und zur Entwicklung von Therapieansätzen sind geeignete Tiermodelle unverzichtbar (Übersicht in NAKAMURA und TAKEDA 2011). Das ursprüngliche DMD-Mausmodell (*mdx*) entstand spontan im Maus-Inzuchtstamm C57BL/10 und hat eine *Nonsense*-Mutation im Exon 23 des *Dmd*-Gens. Inzwischen wurden vier weitere *mdx*-Mausmutanten identifiziert. Darüber hinaus wurde auch eine *Dmd*-Exon-52-defiziente Mausmutante über gezielte Mutagenese generiert. Die *mdx*-Mausmodelle entwickeln jedoch nur einen moderaten klinischen Phänotyp und haben eine annähernd normale Lebenserwartung (BULFIELD et al. 1984, IM et al. 1996, ARAKI et al. 1997). Mutationen im *DMD*-Gen wurden auch in einigen Hunderassen, wie dem Golden Retriever, dem Rottweiler, dem Deutsch Kurzhaar und dem Cavalier King Charles Spaniel, identifiziert (Übersicht in NAKAMURA und TAKEDA 2011), wobei die Muskeldystrophie des Golden Retriever (GRMD) am besten charakterisiert ist (SHARP et al. 1992).

Die GRMD wird durch eine Punktmutation in der Spleiß-Akzeptor-Stelle von Intron 6 des *DMD*-Gens verursacht, was zum Skipping von Exon 7 und zu einem vorzeitigen Stopp-Codon in Exon 8 führt. Dystrophin-defiziente GRMD-Hunde sind klinisch und pathologisch stärker betroffen als die *mdx*-Mausmutanten, sie zeigen jedoch einen variablen Phänotyp und sind schwierig zu züchten. Zudem unterscheidet sich die *DMD*-Mutation bei der GRMD von der Mehrheit der *DMD*-Mutationen bei humanen Patienten, bei denen es einen Hotspot für Deletionen im Bereich der Exons 45 bis 55 gibt. Dies ist insbesondere dann relevant, wenn im Tiermodell gezielte therapeutische Ansätze, wie z. B. Exon-Skipping, getestet werden sollen. Das Prinzip des Exon-Skipping ist, dass zusätzlich zu dem genetisch deletierten Exon durch alternatives Spleißen der RNA ein weiteres Exon entfernt wird, um einen intakten Leserahmen herzustellen. Das alternative Spleißen kann durch Behandlung mit einem *Antisense*-Oligonu-

kleotid (AON) gegen das zu entfernende Exon forciert werden. Dieser Ansatz befindet sich bereits in der klinischen Testung (Übersicht in FAIRCLOUGH et al. 2013), allerdings sind viele Fragen nach wie vor offen, die nur schwer in klinischen Studien an DMD-Patienten beantwortet werden können. Diese Fragen betreffen insbesondere den besten zeitlichen Ablauf der AON-Therapie, die beste Route der systemischen Applikation, Parameter für die Bewertung der Wirksamkeit der Behandlung sowie den Zusammenhang zwischen Dystrophin-Abundanz und Muskelfunktion.

Zur Klärung dieser Fragen wird ein Tiermodell benötigt, das eine *DMD*-Mutation trägt, die beim Menschen vorkommt und durch Exon-Skipping behandelt werden kann. Zudem sollte der biochemische, klinische und pathologische Phänotyp des Modells der humanen *DMD* entsprechen, um die therapeutische Wirkung des Exon-Skippings bewerten zu können.

Das Schwein ist ein etabliertes Modelltier für die biomedizinische Forschung, das wichtige anatomische und physiologische Charakteristika des Menschen widerspiegelt (Übersicht in AIGNER et al. 2010). Zudem ist inzwischen das Methodenspektrum der reversen Genetik für das Schwein sehr gut etabliert, so dass die Ursachen genetisch bedingter Krankheiten im Schwein auf molekularer Ebene nachgeahmt werden können. Nach diesem Prinzip wurden beispielsweise Schweinemodelle für die Mukoviszidose (ROGERS et al. 2008, KLYMIUK et al. 2012), für den erblichen Darmkrebs (FLISIKOWSKA et al. 2012) sowie für den permanenten neonatalen Diabetes mellitus (RENNER et al. 2013) generiert.

Mittels homologer Rekombination in somatischen Zellen und anschließendem Kerntransfer haben wir ein Schweinmodell etabliert, in dem Exon 52 des *DMD*-Gens deletiert und somit eine häufige Mutation bei der humanen *DMD* (MUNTONI et al. 2003) nachgebildet ist. Dieses Modell stimmt in wichtigen biochemischen, klinischen und pathologischen Veränderungen mit der *DMD* des Menschen überein. Allerdings zeigt das *DMD*-Schwein einen akzelerierten Krankheitsverlauf, so dass die Wirksamkeit von therapeutischen Ansätzen in überschaubaren Zeiträumen geprüft werden kann. Zudem lieferten Transkriptom-Studien der Skelettmuskulatur von 2 Tage alten und 3 Monate alten *DMD*-Schweinen und altersentsprechenden Kontrolltieren neue Einblicke in die Hierarchie pathophysiologischer Veränderungen bei der Duchenne-Muskeldystrophie (KLYMIUK et al. 2013).

## 2. Generierung eines *DMD*-Exon 52-defizienten Schweinmodells

In einem künstlichen Bakterienchromosom (BAC; CH242-9G11) mit dem relevanten Teil des porzinen *DMD*-Gens wurde die dem Exon 52 des humanen *DMD*-Gens entsprechende Region mittels „Recombineering“ (COPELAND et al. 2001) durch ein Neomycin-Resistenzgen (*neo*<sup>®</sup>) ersetzt (Abb. 1A), was zu einer Verschiebung des Leserahmens im Transkript führt (MUNTONI et al. 2003). Die so modifizierten BACs wurden in primäre Nierenzellen eines 3 Monate alten männlichen Schweins (RICHTER et al. 2012) transfiziert, und die nach Selektion erhaltenen Zellklone mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf den Verlust von *DMD*-Exon 52 gescreent. Acht von 381 untersuchten Zellklonen (2,1 %) trugen die gezielte *DMD*-Mutation, und zwei Zellklone wurden für den Kerntransfer eingesetzt, um *DMD*-mutante Nachkommen zu erzeugen. In diesen wurde der Verlust des *DMD*-Exons 52 durch PCR bestätigt (Abb. 1B). Die ersten beiden lebend geborenen *DMD*-Ferkel (#1263, #1264) sind in Abbildung 1C gezeigt.

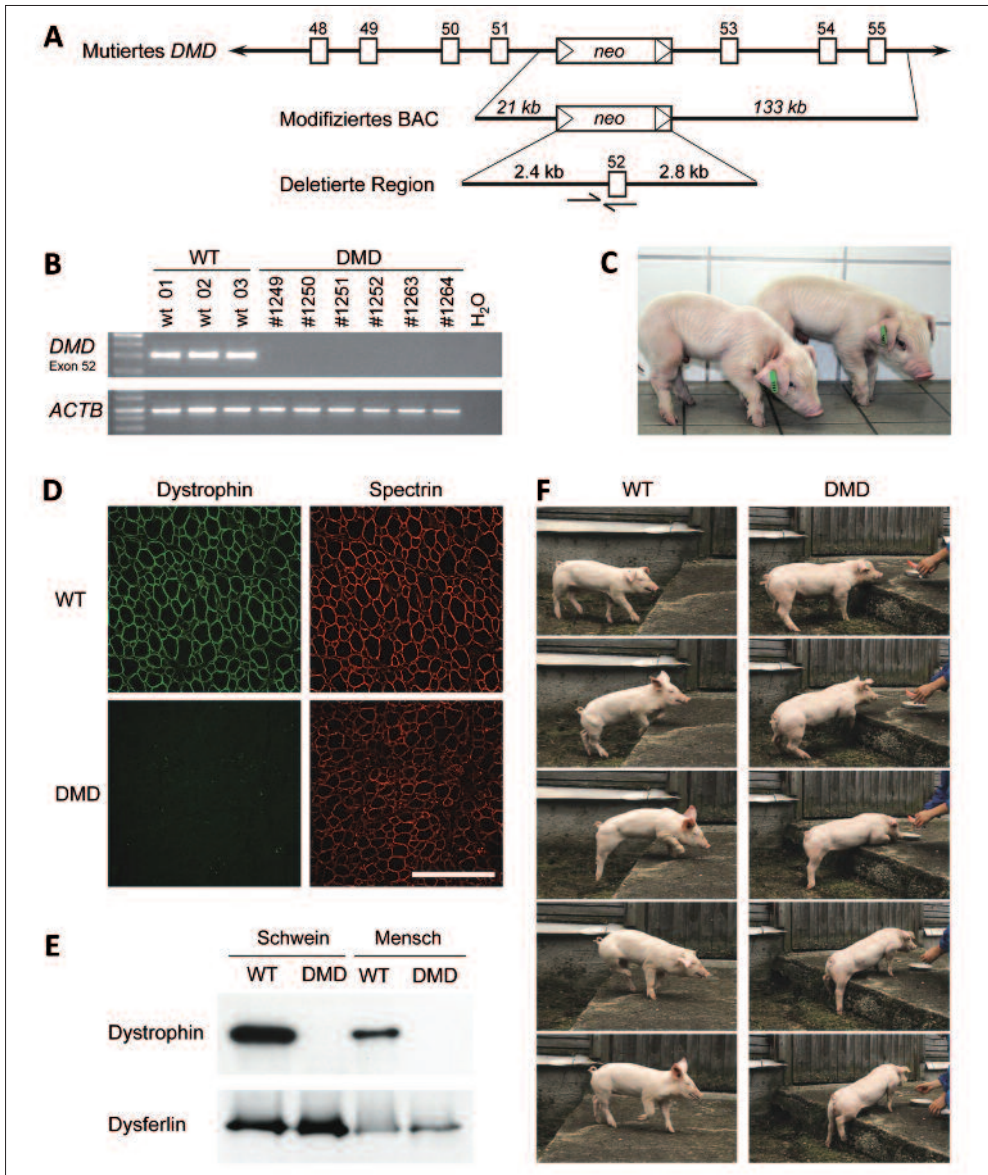


Abb. 1 Zielgerichtete Deletion von Exon 52 des porcinen *DMD*-Gens und Auswirkungen auf die Dystrophin-Expression und Muskelfunktion. (A) Ersatz von *DMD*-Exon 52 im Targeting-BAC durch eine Neomycin-Resistenz (*neo*<sup>®</sup>)-Kassette. Die Positionen der Primer zum Nachweis des Verlustes von Exon 52 in den transfizierten Zellen durch PCR sind durch Pfeile markiert. (B) Genomische PCR-Analyse, die den Verlust von *DMD*-Exon 52 in geklonten Ferkeln zeigt; WT = Wildtyp; *ACTB* =  $\beta$ -Aktin-Gen. (C) 10 Tage alte *DMD*-mutante Ferkel. (D) Immunfluoreszenz-Analyse zum Nachweis der Absenz von Dystrophin im Musculus biceps femoris eines *DMD*-Schweins. Anti-Spektin-Antikörper wurden zur Membranfärbung verwendet; Originalvergrößerung  $\times 400$ ; Balken = 50  $\mu\text{m}$ . (E) Western-Blot-Analyse, welche das Fehlen von Dystrophin in der Muskulatur von *DMD*-Schweinen und *DMD*-Patienten bestätigt. Anti-Dysferlin-Antikörper wurden verwendet, um die gleiche Beladung der Spuren des Gels innerhalb einer Spezies zu zeigen. (F) Unfähigkeit eines 9 Wochen alten *DMD*-Schweins auf eine 25 cm hohe Plattform zu springen (modifiziert nach KLYMIUK et al. 2013, mit Erlaubnis von Oxford University Press).



### *2.1 Dystrophindefizienz und reduzierte Expression Dystrophin-assoziiierter Proteine*

Mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Domänen des humanen Dystrophin-Proteins konnten wir mittels Immunfluoreszenz-Analysen die Expression von Dystrophin im Bereich der Muskelfaser-Membranen von Wildtyp (WT)-Ferkeln zeigen, während bei DMD-Ferkeln kein Dystrophin nachweisbar war (Abb. 1D), was der Situation bei der Mehrheit der DMD-Patienten entspricht (KERR et al. 2001). Das Fehlen von Dystrophin wurde zudem in einer Western-Blot-Analyse bestätigt (Abb. 1E). Da die Abundanz Dystrophin-assoziiierter Proteine (DAPs) in der Muskulatur von DMD-Patienten reduziert ist (Übersicht in ERVASTI 2007), wurde die Expression von  $\alpha$ -Sarcoglycan und  $\beta$ -Dystroglycan in der Skelettmuskulatur von DMD-Ferkeln mittels Immunfluoreszenz evaluiert. Beide DAPs waren – wie auch beim DMD-Patienten – im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen in ihrer Abundanz reduziert (KLYMIUK et al. 2013).

### *2.2 Dystrophindefizienz im Schwein resultiert in hochgradiger Muskelschwäche*

Die DMD-Ferkel #1263 und #1264 zeigten im Vergleich zu WT-Kontrollen gleichen Alters eine reduzierte Mobilität, konnten sich jedoch selbstständig bewegen und Nahrung aufnehmen. Die im Alter von 3 Tagen gemessenen Serum-Kreatinkinase-Werte waren deutlich erhöht (1649 und 2117 U/l im Vergleich zu  $210 \pm 112$  U/l bei fünf gleichaltrigen WT-Kontrollen).

Eine Bewegungsanalyse, die bei DMD-Schwein #1263 im Alter von 9 Wochen durchgeführt wurde, zeigte, dass die Bewegungsabläufe aller drei Gangarten (Schritt, Trab, Galopp) im Vergleich zu einem WT-Schwein entsprechender Körpermasse verändert waren. Auffällig waren vor allem die verkürzte Schrittlänge und die steifen Bewegungen.

Die hochgradige Muskelschwäche des DMD-Schweins zeigte sich bei dem Versuch, eine Plattform (Höhe 25 cm) zu besteigen. Während die WT-Kontrolle problemlos wiederholt auf die Plattform und wieder herunter springen konnte, war es DMD-Schwein #1263 nicht möglich, diese auch nur ein einziges Mal zu besteigen.

### *2.3 Der Schweregrad des DMD-Phänotyps korreliert mit dem Geburtsgewicht*

Um die phänotypischen Konsequenzen der DMD-Defizienz im Schwein systematisch zu charakterisieren, wurden insgesamt 22 weitere DMD-Ferkel durch Kernttransfer generiert. Die neugeborenen DMD-Ferkel wiesen eine große Streuung ihrer Geburtsgewichte auf, was eine bekannte Nebenwirkung der Kernttransfertechnologie beim Schwein darstellt (ESTRADA et al. 2007) und vermutlich in keinem Zusammenhang mit der *DMD*-Mutation steht. Interessanterweise konnten wir eine negative Korrelation zwischen Geburtsgewicht und Lebenserwartung der DMD-Schweine feststellen (Abb. 2A). Tiere mit einem Geburtsgewicht, das über 1200 g lag, starben innerhalb der ersten Lebensstage. Die klinischen Symptome ließen auf eine Muskelschwäche und Atemprobleme als primäre Todesursachen schließen. DMD-Ferkel mit einem relativ geringen Geburtsgewicht wurden hingegen bis zu 3 Monate alt. Im Alter von 4 Wochen lagen ihre Serum-Kreatinkinase-Werte zwischen 21 000 und 63 000 U/l und waren damit massiv erhöht. Zusätzlich durchgeführte Bewegungsanalysen von zwei 10 Wochen alten DMD-Schweinen bestätigten die am Tier #1263 beobachteten Bewegungsstörungen und eine ausgeprägte Muskelschwäche.

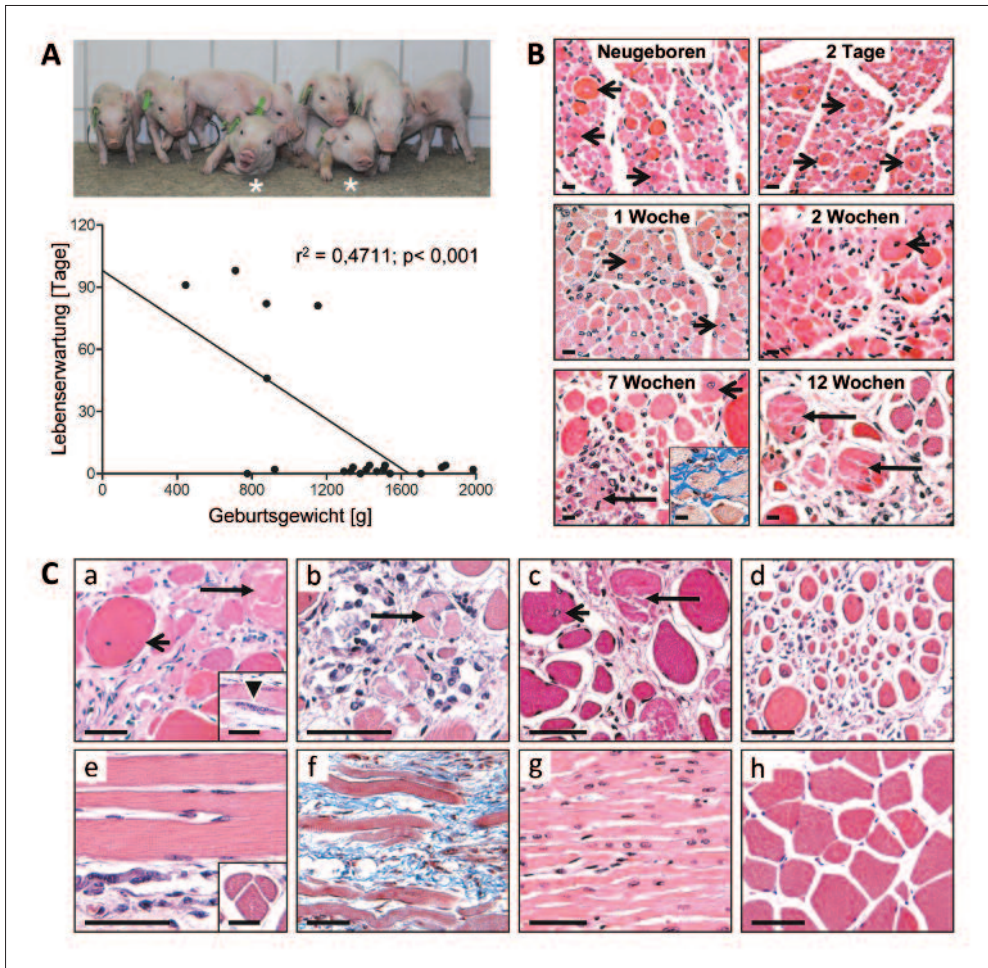


Abb. 2 Geburtsgewichte, Lebenserwartung und pathologische Veränderungen von DMD-Schweinen. (A) Bei den DMD-Schweinen zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen Geburtsgewicht und Lebenserwartung. Das Foto zeigt eine repräsentative Gruppe von neugeborenen DMD-Ferkeln. Die Tiere mit den höchsten Geburtsgewichten (1820 und 1980 g; markiert durch Sterne) verstarben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt. (B) Altersabhängige Progression der strukturellen Veränderungen der Skelettmuskulatur von DMD-Schweinen. Gezeigt ist die Paraffinhistologie des Musculus biceps femoris nach Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E). Inset: Nachweis der interstitiellen Fibrose mittels Massons Trichrom-Färbung (blau). Kurze Pfeile zeigen auf große, abgerundete Muskelfasern mit zentralen Kernen, lange Pfeile markieren Muskelfasernekrosen. Balken = 10  $\mu\text{m}$ . (C) Histopathologie der Muskeln eines 3 Monate alten DMD-Schweins (a–g) und eines Kontrollschweins entsprechenden Alters (h). Paraffinschnitte, H&E-Färbung (a–e, g–h) bzw. Massons Trichrom-Färbung (f). Balken = 50  $\mu\text{m}$ , Balken im Inset von e = 10  $\mu\text{m}$ . Querschnitte aus dem Musculus triceps brachii (a, h), dem Diaphragma (linker Pfeil, b), dem Musculus thyreochoideus (c), und dem Musculus longissimus dorsi (d) zeigen eine starke Variation der Faserdurchmesser mit hypertrophen, abgerundeten Fasern und zentralständigen Kernen (kurze Pfeile), Regeneration von Muskelfasern (Pfeilspitze im Inset von a) und Muskelfasernekrosen (lange Pfeile) mit peri- und endomyosialer mononukleärer Zellinfiltration (b). e (Musculus triceps brachii, Längsschnitt; Inset: Musculus biceps femoris, Querschnitt): Verzweigung/Splitting von Muskelfasern. f (Zwerchfell, Längsschnitt): Interstitielle Fibrose (blaue Färbung). g (Herzmuskulatur, linker Ventrikel, Längsschnitt): Unauffällige Histomorphologie (modifiziert nach KLYMIUK et al. 2013, mit Erlaubnis von Oxford University Press).



#### 2.4 DMD-Schweine zeigen einen fulminanten Verlauf der Muskeldystrophie

DMD-Schweine verschiedener Altersstufen und jeweils gleichaltrige WT-Kontrollen wurden systematischen pathologischen Analysen unterzogen. Dabei zeigten die DMD-Schweine eine blasse feuchte Skelettmuskulatur mit multifokalen, vor allem im Zwerchfell und in der Interkostalmuskulatur vorkommenden, beige-aufgehellten Arealen. Außerdem wurden bei der histologischen Untersuchung typische myopathologische Befunde, ähnlich den Befunden bei der humanen Duchenne-Muskeldystrophie, erhoben. Sowohl Schweregrad als auch Ausmaß der Veränderungen nahmen mit steigendem Alter zu (Abb. 2B), wobei Zwerchfell, Kehlkopf- und Interkostalmuskulatur besonders schwer betroffen waren. Es gab jedoch keine histopathologischen Befunde, die auf eine Involvierung des Myokards/Herzmuskels deuteten. Insgesamt sprechen die klinischen und pathologischen Untersuchungen für eine, im Vergleich zur DMD des Menschen, beschleunigte progressive Muskeldystrophie bei DMD-Schweinen.

#### 2.5 Altersabhängige Transkriptomveränderungen in der Skelettmuskulatur von DMD-Schweinen

Um einen Einblick in die molekularen Veränderungen der DMD beim Schwein zu gewinnen, führten wir Transkriptom-Untersuchungen der Skelettmuskulatur von 2 Tage alten ( $n = 4$ ) und 3 Monate alten DMD-Schweinen ( $n = 3$ ) sowie altersentsprechenden WT-Kontrollen (jeweils  $n = 3$ ) durch. Die Transkriptomveränderungen bei 3 Monate alten DMD-Schweinen stimmten sehr gut mit den Befunden von Genexpressionsstudien humaner DMD-Muskulatur überein. Eine Gen-Ontologie-Analyse der Transkripte mit vermehrter Abundanz bei 3 Monate alten DMD-Schweinen wies auf degenerative und regenerative Prozesse, eine Entzündungsreaktion sowie auf eine Umbildung der extrazellulären Matrix und eine Fibrose hin. Dagegen war die Abundanz von Transkripten stoffwechselrelevanter Gene in der Skelettmuskulatur der DMD-Schweine vermindert. Die Transkriptomveränderungen der Skelettmuskulatur von 2 Tage alten DMD-Ferkeln wiesen dagegen Ähnlichkeiten mit denen einer Überlastungsmyopathie auf. Dieser Befund steht im Einklang mit einer bereits früher formulierten Hypothese, dass mechanische Schädigungen der Muskelzellen in Frühstadien der Duchenne-Muskeldystrophie eine wichtige Rolle spielen (Übersicht in BLAKE et al. 2002). Beim Schwein kommt dies möglicherweise stärker zum Tragen als bei anderen Spezies, da neugeborene Ferkel als Nestflüchter kurz nach der Geburt einen Großteil ihrer Muskeln mechanisch belasten. Ein weiterer Faktor, der für den fulminanten Verlauf der Muskeldystrophie des DMD-Schweins eine Rolle spielen könnte, ist das schnelle Muskelwachstum durch Hypertrophie der Muskelfasern.

### 3. Schlussfolgerungen und Ausblick

Das DMD-Exon 52-defiziente Schwein (KLYMIUK et al. 2013) erscheint als *Bona-fide*-Modell für die humane Duchenne-Muskeldystrophie. Das vollständige Fehlen von Dystrophin entspricht der Situation beim Großteil der DMD-Patienten (KERR et al. 2001). Weitere Übereinstimmungen sind das reduzierte Vorkommen Dystrophin-assoziiierter Proteine, die erhöhten Serum-Kreatinkinase-Werte und die progressive Muskeldystrophie, die sich sowohl klinisch als auch bei den pathologischen wie auch histologischen Untersuchungen bestätigen ließ. Im

Vergleich zu DMD-Patienten ist der Verlauf der Muskeldystrophie bei den DMD-Schweinen jedoch stark beschleunigt. Dies bietet die hervorragende Möglichkeit bereits frühzeitig die Effizienz von Therapieansätzen zu prüfen. Da männliche DMD-Schweine vor Erreichen der Zuchtreife sterben und daher nicht durch Zucht vermehrt werden können, arbeiten wir derzeit an der Generierung heterozygoter ( $DMD^{+/\Delta Exon52}$ ) weiblicher Tiere. Die Hälfte ihrer Nachkommen sollte die DMD-Mutation erben, von denen die männlichen Tiere für Behandlungsstudien und die weiblichen Tiere für die Propagation der Linie über Zucht verwendet werden können. Damit sollte es mittelfristig möglich sein, ausreichend viele DMD-Schweine für die Entwicklung und Testung neuer Therapien für die Duchenne-Muskeldystrophie, wie Exon-Skipping, Gen- und Stammzelltherapien, bereitzustellen.

### Dank

Das Projekt zur Erstellung des DMD-Schweinmodells wurde durch die Bayerische Forschungstiftung (AZ 802-08) sowie durch die Aktion Benni & Co. gefördert.

### Literatur

- AIGNER, B., RENNER, S., KESSLER, B., KLYMIUK, N., KUROME, M., WUNSCH, A., and WOLF, E.: Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J. Mol. Med. (Berl.)* 88, 653–664 (2010)
- ARAKI, E., NAKAMURA, K., NAKAO, K., KAMEYA, S., KOBAYASHI, O., NONAKA, I., KOBAYASHI, T., and KATSUKI, M.: Targeted disruption of exon 52 in the mouse dystrophin gene induced muscle Degeneration similar to that observed in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 492–497 (1997)
- BLAKE, D. J., WEIR, A., NEWEY, S. E., and DAVIES, K. E.: Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* 82, 291–329 (2002)
- BULFIELD, G., SILLER, W. G., WIGHT, P. A., and MOORE, K. J.: X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1189–1192 (1984)
- COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., and COURT, D. L.: Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nature Rev. Genet.* 2, 769–779 (2001)
- ERVASTI, J. M.: Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 108–117 (2007)
- ESTRADA, J., SOMMER, J., COLLINS, B., MIR, B., MARTIN, A., YORK, A., PETTERS, R. M., and PIEDRAHITA, J. A.: Swine generated by somatic cell nuclear transfer have increased incidence of intrauterine growth restriction (IUGR). *Cloning Stem Cells* 9, 229–236 (2007)
- FAIRCLOUGH, R. J., WOOD, M. J., and DAVIES, K. E.: Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nature Rev. Genet.* 14, 373–378 (2013)
- FLISIKOWSKA, T., MERKL, C., LANDMANN, M., ESER, S., REZAEI, N., CUI, X., KUROME, M., ZAKHARTCHENKO, V., KESSLER, B., WIELAND, H., ROTTMANN, O., SCHMID, R. M., SCHNEIDER, G., KIND, A., WOLF, E., SAUR, D., and SCHNIEKE, A.: A porcine model of familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 143, 1173–1175. e1–7 (2012)
- HOFFMAN, E. P., BROWN, R. H. Jr., and KUNKEL, L. M.: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928 (1987)
- IM, W. B., PHELPS, S. F., COPEN, E. H., ADAMS, E. G., SLIGHTOM, J. L., and CHAMBERLAIN, J. S.: Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1149–1153 (1996)
- KERR, T. P., SEWRY, C. A., ROBB, S. A., and ROBERTS, R. G.: Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum. Genet.* 109, 402–407 (2001)
- KLYMIUK, N., BLUTKE, A., GRAF, A., KRAUSE, S., BURKHARDT, K., WUENSCH, A., KREBS, S., KESSLER, B., ZAKHARTCHENKO, V., KUROME, M., KEMTER, E., NAGASHIMA, H., SCHOSER, B., HERBACH, N., BLUM, H., WANKE, R., AARTSMA-RUS, A., THIRION, C., LOCHMULLER, H., WALTER, M. C., and WOLF, E.: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.* 22/21, 4368–4382 (2013)

- KLYMIUK, N., MUNDHENK, L., KRAEHE, K., WUENSCH, A., PLOG, S., EMRICH, D., LANGENMAYER, M. C., STEHR, M., HOLZINGER, A., KRONER, C., RICHTER, A., KESSLER, B., KUROME, M., EDDICKS, M., NAGASHIMA, H., HEINRITZI, K., GRUBER, A. D., and WOLF, E.: Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *J. Mol. Med.* 90, 597–608 (2012)
- KOENIG, M., BEGGS, A. H., MOYER, M., SCHERPF, S., HEINDRICH, K., BETTECKEN, T., MENG, G., MULLER, C. R., LINDLOF, M., KAARIAINEN, H., et al.: The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Amer. J. Hum. Genet.* 45, 498–506 (1989)
- MUNTONI, F., TORELLI, S., and FERLINI, A.: Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2, 731–740 (2003)
- NAKAMURA, A., and TAKEDA, S.: Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 184393 (2011)
- RENNER, S., BRAUN-REICHHART, C., BLUTKE, A., HERBACH, N., EMRICH, D., STRECKEL, E., WUNSCH, A., KESSLER, B., KUROME, M., BAHR, A., KLYMIUK, N., KREBS, S., PUK, O., NAGASHIMA, H., GRAW, J., BLUM, H., WANKE, R., and WOLF, E.: Permanent neonatal diabetes in INS<sup>C94Y</sup> transgenic pigs. *Diabetes* 62, 1505–1511 (2013)
- RICHTER, A., KUROME, M., KESSLER, B., ZAKHARTCHENKO, V., KLYMIUK, N., NAGASHIMA, H., WOLF, E., and WUENSCH, A.: Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnol.* 12, 84 (2012)
- ROGERS, C. S., STOLTZ, D. A., MEYERHOLZ, D. K., OSTEDGAARD, L. S., ROKHLINA, T., TAFT, P. J., ROGAN, M. P., PEZZULO, A. A., KARP, P. H., ITANI, O. A., KABEL, A. C., WOHLFORD-LENANE, C. L., DAVIS, G. J., HANFLAND, R. A., SMITH, T. L., SAMUEL, M., WAX, D., MURPHY, C. N., RIEKE, A., WHITWORTH, K., UC, A., STARNER, T. D., BROGDEN, K. A., SHILYANSKY, J., MCCRAY, P. B. Jr., ZABNER, J., PRATHER, R. S., and WELSH, M. J.: Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 321, 1837–1841 (2008)
- SHARP, N. J., KORNEGAY, J. N., VAN CAMP, S. D., HERBSTREITH, M. H., SECORE, S. L., KETTLE, S., HUNG, W. Y., CONSTANTINOU, C. D., DYKSTRA, M. J., ROSES, A. D., et al.: An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115–121 (1992)
- SPURNEY, C. F.: Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy: current understanding and future directions. *Muscle Nerve* 44, 8–19 (2011)

Prof. Dr. Eckhard WOLF  
Genzentrum der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Feodor-Lynen-Straße 25  
81377 München  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 89 218076800  
Fax: +49 89 218076849  
E-Mail: ewolf@lmu.de

## **Geist – Gehirn – Genom – Gesellschaft**

### **Wie wurde ich zu der Person, die ich bin?**

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

Nova Acta N. F. Bd. 120, Nr. 405

Herausgegeben von Onur GÜNTÜRKÜN (Bochum) und

Jörg HACKER (Halle/Saale, Berlin)

(2014, 252 Seiten, 54 Abbildungen, 1 Tabelle, 29,95 Euro,

ISBN: 978-3-8047-3322-0)

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

## Konsequenzen artifizieller mitochondrialer Heteroplasmie im Tiermodell

Jörg BURGSTALLER und Gottfried BREM ML, wM ÖAW (Wien, Österreich)

Mit 2 Abbildungen und 1 Tabelle

### Zusammenfassung

Erkrankungen, denen Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) zugrunde liegen, spielen beim Menschen mit einer Häufigkeit von bis zu 1 in 5000 eine wichtige Rolle. Bei (Haus-) Tieren gibt es dagegen, wahrscheinlich weil die Diagnose schwierig ist und daher selten gestellt wird, nur sehr wenige Fälle. Die mtDNA befindet sich in jeder kernhaltigen Zelle in einigen hundert bis tausend Kopien. mtDNA wird nur maternal vererbt, wodurch sich in jeder Zelle normalerweise nur ein Typ von mtDNA befindet (Homoplasmie). Kommt es zu pathologischen Mutationen, führen diese ab einem Schwellenwert von ca. 70 % mutierter DNA (Heteroplasmie; Wildtyp und mutierte mtDNA gemeinsam in einer Zelle) zu Erkrankungen. Betroffen sind meist post-mitotische Gewebe wie das Zentralnervensystem und die Muskulatur. Da diese Erkrankungen nur palliativ behandelt werden können, spielen Tiermodelle bei der Erforschung präklinischer Therapieversuche eine große Rolle. Da die mtDNA noch nicht gezielt gentechnisch verändert werden kann, resultieren bei der Erstellung von Tiermodellen große Probleme. *In vivo* wird systematisch hauptsächlich an Mäusen geforscht, doch bisher gibt es nur wenige Mausmodelle, die eine humane Erkrankung exakt modellieren.

### Abstract

Mitochondrial DNA (mtDNA) based diseases are relatively common in human medicine, with an incidence of 1 in 5000. However, in domestic and farm animals very few cases are reported, most likely because diagnostic procedures are demanding and difficult, and, therefore, these diseases are prone to be missed by routine diagnosis. mtDNA is present in every nucleated cell in several hundred to several thousand copies. mtDNA is strictly maternally inherited, which leads to homoplasmie, i.e. only one type of mtDNA existing in a cell. mtDNA shows a high mutation rate, and once a threshold of 70 % mutated mtDNA is reached (heteroplasmie, i.e. wild-type and mutated mtDNA are simultaneously present in the cell) the disease manifests itself. Typically post-mitotic tissues like central nervous system or muscle are affected. As these diseases can currently only be treated palliatively, animal models play an important role for testing new preclinical treatments. Currently the creation of new animal models is hampered by the impossibility of genetic engineering of mtDNA. Systematic *in vivo* studies are mainly performed with mouse models, however only few models exactly mirror human diseases.

### 1. Die mitochondriale DNA

Jede höhere eukaryotische Zelle besitzt neben dem Kerngenom auch mitochondriale DNA (mtDNA), welche in den Mitochondrien lokalisiert ist und in einigen hundert bis einigen tausend Kopien pro Zelle vorkommt. Eizellen enthalten bis zu einigen 100 000 mtDNAs (WAI et al. 2010). Die mtDNA codiert für 13 Schlüsselproteine der Atmungskette sowie für eigene ribosomale und Transfer-RNAs (SHOUBRIDGE 2000). In den Mitochondrien ist die mtDNA in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, wo sie an der inneren Membran befestigt ist und durch spezielle Proteine dicht gepackt und vor Sauerstoffradikalen geschützt wird. In diesen soge-

nannten Nukleoiden befinden sich nach neuesten Erkenntnissen nur ein bis zwei (KUKAT et al. 2011), anstatt wie bisher angenommen bis zu zehn mtDNAs (GILKERSON 2009). Den Nukleoiden kommt eine wichtige Rolle während der ständig stattfindenden Teilungen und Fusionen von Mitochondrien zu. In jedem neu gebildeten Teil eines Mitochondriums muss sich mindestens ein Nukleoid befinden (GILKERSON 2009).

Die mtDNA wird bei Säugetieren rein maternal vererbt, die Mitochondrien im Mittelstück der Spermien sind ubiquitiniert (SUTOVSKY et al. 1999, 2000) und damit zum Abbau markiert (AL RAWI et al. 2011, CUMMINS et al. 1998, DELUCA und O'FARRELL 2012, SATO und SATO 2011, SHITARA et al. 2000), sobald die Befruchtung stattgefunden hat. Paternale mtDNA findet man nur in abnormalen Embryos oder in Interspezies-Kreuzungen (GYLLENSTEN et al. 1991, ST JOHN et al. 2000). Möglicherweise wird die mtDNA im Spermium sogar schon vor der Befruchtung abgebaut (LUO et al. 2013). Ein einzelner Fall von paternaler Vererbung von mtDNA beim Menschen ist bekannt (SCHWARTZ und VISSING 2002).

Die streng maternale Vererbung der mtDNA führt dazu, dass in jeder Zelle normalerweise nur identische mtDNAs vorkommen. Dieser Zustand wird als Homoplasmie bezeichnet.

## 2. mtDNA-Heteroplasmie

Während mtDNA-Homoplasmie der „Normalzustand“ eines Säugetiers ist, kommt es aber trotzdem vor, dass Zellen zwei unterschiedliche Populationen von mtDNA beinhalten. Dieser Zustand wird „Heteroplasmie“ genannt. Die Gründe dafür sind physiologischerweise ständig auftretende Spontanmutationen. Ihre Beteiligung am Alterungsprozess ist noch unklar (SONDHEIMER et al. 2011). Allerdings können solche Mutationen auch in der Keimbahn auftreten, so dass Heteroplasmie auch „geerbt“ werden kann. Es wird geschätzt, dass jeder Mensch im Gewebe ein geringes Maß (0,2 bis 2 %) an Heteroplasmie aufweist (PAYNE et al. 2013). In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass viele dieser Mutationen vererbt werden (ca. 40 %).

Heteroplasmie entsteht auch bei assistierten reproduktionsmedizinischen Methoden: Bei Tieren wird während des Klonierens zusammen mit dem Zellkern auch Zytoplasma und damit mtDNA in die Eizelle übertragen (STEINBORN et al. 2000). Beim Menschen wurde versucht, mittels Übertragung von 5 bis 15 % des Ooplasmas einer fertilen Eizelle die Entwicklungsfähigkeit einer nicht-fertilen zu steigern, was in den Nachkommen zu Heteroplasmie führte (BARRITT et al. 2001).

## 3. Mitochondriale Erkrankungen bei Mensch und Tier

Es wird angenommen, dass unterschiedliche mtDNA-Haplotypen sowohl beim Menschen als auch beim Tier Anpassungen an bestimmte Lebensräume darstellen (NING et al. 2010, WALLACE und CHALKIA 2013). Nicht alle Mutationen sind (zumindest in bestimmten Lebensräumen) von Vorteil oder neutral, es gibt auch viele, die sich negativ auswirken. Obwohl die meisten schon in der Keimbahn durch einen „Reinigungsmechanismus“ eliminiert zu werden scheinen (STEWART et al. 2008), kommt es immer wieder zu Erkrankungen, die auf Mutationen der mtDNA basieren. Diese können *de novo* entstehen und/oder vererbbar werden (PAYNE et al. 2013).

Während solche Erkrankungen beim Menschen relativ häufig sind (POULTON et al. 2010), gibt es bei Tieren nur wenige Berichte. Das liegt vermutlich nicht daran, dass diese Erkrankungen bei Tieren nicht auftreten, sondern an der schwierigen und aufwändigen Diagnostik. Obwohl alle mtDNA-Mutationen auf irgendeine Art die Atmungskette beeinflussen und man daher auf ein einheitliches klinisches Bild schließen könnte, zeichnen sich mitochondriale Erkrankungen durch eine Vielfalt von Symptomen aus. Prinzipiell sind durch die Störung der Atmungskette meist jene Organe, die einen erhöhten Energiebedarf aufweisen, wie das zentrale und periphere Nervensystem und die Muskulatur (HOLMGREN et al. 2003, WALLACE 1999), am stärksten betroffen. Doch auch Leber, Niere, Darm und Sehnerv werden oft primär oder sekundär geschädigt.

Darüber hinaus treten mtDNA-basierte Erkrankungen meist nicht homoplasmatisch auf, sondern auch bei einer Mischung aus mutierter- und nicht-mutierter mtDNA in den Zellen. Erst ab einem Schwellenwert von ca. 70 % mutierter mtDNA treten klinische Symptome auf (JEPPESEN et al. 2006). Dieser Dosis-effekt des (organspezifischen) Grades der Heteroplasmie erschwert eine zuverlässige Diagnose weiter. Es ist auch ein Fall einer dominanten mtDNA-Mutation mit einem Schwellenwert von nur ca. 4 % mutierter mtDNA bekannt (SACCONI et al. 2008).

Beim Tier werden mtDNA-basierte Erkrankungen sehr selten beobachtet. Sie wurden bei Ratten (MATHEWS et al. 1995), Shetland Sheepdogs und Australian Cattle Dogs (LI et al. 2006) und Golden Retriever (BARANOWSKA et al. 2009) beschrieben. Im Gegensatz dazu treten diese Erkrankungen beim Menschen – je nach Quelle – mit einer Inzidenz von 1 in 300 (MANWARING et al. 2007) bis 1 in 14000 (CHINNERY et al. 2000) auf. Die Mehrheit dieser Erkrankungen tritt heteroplasmatisch auf, weshalb sich viele Forscher auf Methoden konzentrieren, die mutierte mtDNA zugunsten der nicht-mutierten *in vivo* zurückzudrängen (POULTON et al. 2010).

#### 4. Heteroplasmatische Tiermodelle

Da es sehr wenige spontan entstandene Tiermodelle mitochondrialer Erkrankungen gibt, wird versucht, diese künstlich herzustellen – hauptsächlich als Modelle für humane Erkrankungen und in der Grundlagenforschung (FARRAR et al. 2013, TYYNISMAA und SUOMALAINEN 2009). Leider gibt es bei der mtDNA derzeit keine Möglichkeit des „genetic engineering“, d. h., in die mtDNA können keine gezielten Mutationen eingeführt werden (FARRAR et al. 2013). Es gibt prinzipiell nur zwei „Typen“ von mtDNA-Modellen:

- natürliche mtDNA-Haplotypen, die sich je nach genetischer Verwandtschaft in einer unterschiedlichen Anzahl von Einzelbasenaustauschen (SNPs) unterscheiden; und
- mtDNA, die auf irgendeine Weise (*in vivo* in somatischen Zellen oder *in vitro* in Zellkultur) zufällig mutiert ist.

Das bekannteste Beispiel für ein heteroplasmatisches Tiermodell mit zwei physiologischen mtDNAs ist das „New Zealand Black (NZB)/Common Inbred Strain (CIS)“-Modell, das erstmalig 1996 publiziert wurde (JENUTH et al. 1996). Während die meisten Labormäuse fast identische mtDNAs haben, da sie von wenigen Muttertieren abstammen (GOIOS et al. 2007), ist der NZB-Stamm eine Ausnahme. Deshalb wurde die NZB-mtDNA in mehreren Modellen mit CIS-mtDNA gemischt, um die Grundzüge der mtDNA-Vererbung zu erforschen. Ein Großteil des heutigen Wissens über mtDNA-Segregation wurde mit diesem Modell erarbeitet. Einen Überblick über die verwendeten Modelle gibt Tabelle 1.



Tab. 1 Heteroplasmatische Tiermodelle mit physiologischer mtDNA

Spezies	mtDNA- Spezies	Methode	Gewebe	Physiologie	Referenz
Maus	NZB + BALB/cByJ <i>M. m. domesticus</i>	Zytoplasten- fusion	Leber, Niere, Blut, Milz	nicht analysiert	JENUTH et al. 1997
Maus	NZB + 129S6 <i>M. m. domesticus</i>	Zytoplasten- fusion	Leber, Niere, Milz, Pankreas	verändertes Verhalten	SHARPLEY et al. 2012
Maus	NZB + BALB/cByJ <i>M. m. domesticus</i>	Zytoplasten- fusion	nicht analysiert	Blutwerte verändert, Bluthochdruck	ACTON et al. 2007
Maus	Hausmäuse aus Wildfängen + C57/BL6N 3× <i>M. m. domesticus</i> 1× <i>M. m. musculus</i>	Ooplasma- transfer	12 verschiedene Organe (mit ver- schiedenen Segre- gationsmechanis- men)	nicht analysiert	BURGSTALLER et al. 2014
Maus	RR + C57BL/6 <i>M. m. molossinus</i> / <i>M. m. domesticus</i>	Blastomer- fusion	alle, verglichen mit post-mitoti- schem Gewebe	nicht analysiert	TAKEDA et al. 2000
Maus	JF1+ C57BL/6 <i>M. m. molossinus</i> / <i>M. m. domesticus</i>	Kerntransfer	Leber; verglichen mit Gehirn	nicht analysiert	INOUE et al. 2004
Schwein	Meishan + Landrasse <i>S. vittatus</i> <i>S. scrofa</i>	Kerntransfer	Leber; verglichen mit Milz, Ohr, Blut	nicht analysiert	TAKEDA et al. 2006
Rind	Zebu + Taurines Rind <i>B. p. indicus</i> / <i>B. p. taurus</i>	Ooplasma- transfer	Fetus ( <i>B. p. indicu</i> - mtDNA während der Trächtigkeit reduziert)	nicht analysiert	FERREIRA et al. 2010

Während mtDNA nicht gerichtet genetisch verändert werden kann, ist es möglich, mutierte mtDNA von z. B. Körperzellen oder Zellkulturzellen für *In-vivo*-Modelle zu nutzen. Dazu werden die Zellen entkernt und mit Zellkulturzellen oder embryonalen Stammzellen, aus denen vorher ebenfalls die mtDNAs entfernt wurden, z. B. mit Rhodamine-6G (LIN et al. 2012), fusioniert. Aus diesen Zelllinien, die nun die gewünschte mtDNA enthalten, kann dann über die Generierung von Chimären (LIN et al. 2012) oder direkt über Aggregation mit Embryonen (INOUE et al. 2000) wieder eine Mauslinie erstellt werden. Diese enthält die gewünschte (mutierte) mtDNA dann homoplasmatisch oder heteroplasmatisch. Eine interessante Alternative dazu sind Mäuse mit einer mutierten mitochondrialen Polymerase („Mutator-Mäuse“), die dazu führt, dass in diesen Mäusen die mtDNA ständig mutiert. Durch Rückkreuzung mit Wildtyp-Mäusen entstehen Mauslinien, die einerseits mutierte mtDNA aufweisen, andererseits aber wieder genetisch stabil sind. Die zufälligen Mutationen können dann untersucht werden (FREYER et al. 2012).

## 5. Segregation der mtDNA in heteroplasmatischen Tiermodellen

Sind in einer Zelle zwei mtDNA-Typen vorhanden, kann das Verhältnis zwischen den beiden Typen über lange Zeit konstant bleiben oder aber sich dramatisch ändern. Prinzipiell unterliegen

Mitochondrien bzw. die mtDNA einem gewissen „Umsatz“, d. h., sie werden, je nach Gewebe, innerhalb von Tagen bis Wochen (oder sogar Jahren) erneuert. Es ist unklar, ob dieser Umbau zufällig erfolgt oder bevorzugt geschädigte Mitochondrien abgebaut werden. In der Keimbahn scheint es eine gewisse „Reinigungsfunktion“ gegen mutierte mtDNAs zu geben, wobei unklar ist, ob diese auf zellulärer oder mitochondrialer Ebene funktioniert. Bei Mäusen, die eine schwere heteroplasmatische ND6-Mutation aufwiesen, wurde beobachtet, dass diese innerhalb von vier Generationen verschwand, während eine mildere COI-Mutation vererbt wurde (FAN et al. 2008). Kürzlich wurde bei heteroplasmatischen *Drosophila melanogaster*, die eine temperatur-sensitive COI-Mutation hatten, gezeigt, dass die Auswahl der „fitten“ Mitochondrien vermutlich auf bevorzugter Vermehrung nicht-mutierter mtDNA beruht, also innerhalb der Zelle, was einen wichtigen Befund zum Verständnis der Segregation darstellt (HILL et al. 2014).

Das Auftreten von mtDNA-basierten Erkrankungen zeigt jedenfalls, dass dieser Reinigungsmechanismus nicht zu vollständig funktioniert. Deshalb wird versucht, zur Therapie heteroplasmatischer Erkrankungen das Verhältnis zwischen mutierter und nicht-mutierter DNA zugunsten der gesunden mtDNA zu verschieben. Leider ist über die Mechanismen der mitochondrialen „Segregation“, also der Verschiebung im Verhältnis zweier mtDNA-Typen, sehr wenig bekannt. Prinzipiell erzeugt ein zufälliger Umbau der mtDNA in der Zelle eine bestimmte Fluktuation im Verhältnis zweier mtDNAs, wobei zufällige „Drift“ ausreicht, um in einer Zelle nach einer bestimmten Zeit einen der beiden mtDNA-Typen zu fixieren.

Bei vielen heteroplasmatischen mtDNA-Erkrankungen und auch bei heteroplasmatischen Tiermodellen, gibt es eine gerichtete Drift, bei der sich (oft nur in bestimmten Geweben) ein Typ von mtDNA durchsetzt. Das bekannteste Beispiel ist das bereits erwähnte NZB-Mausmodell, bei dem sich die NZB-mtDNA gegenüber der CIS-mtDNA in der Leber durchsetzt, aber im Blut zurückgeht. Da ähnliche Effekte auch bei anderen Tierarten beobachtet wurden (Tab. 1), ist wahrscheinlich, dass sie auch beim Menschen auftreten können. Deshalb wird derzeit versucht, durch gezielte Belastung (Sport), spezielle Ernährung oder durch Gabe von Medikamenten das Verhältnis der mtDNAs in diesen Modellen zu verschieben, um so Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen zu bekommen und um Therapieansätze für die Medizin zu finden.

## 6. Eigene experimentelle Ansätze

Die stärksten Segregationseffekte treten beim schon erwähnten NZB-Mausmodell auf. Innerhalb einiger Wochen bis Monate setzt sich in der Leber und Niere dieser Mäuse die NZB-mtDNA und im Blut und der Milz die CIS-mtDNA durch (JENUTH et al. 1997). Dies passiert fast unabhängig vom Kerngenom. Durch Kreuzung und Rückkreuzung mit einer anderen Subspezies (*Mus musculus castaneus*) konnte der Effekt im hämatopoietischen Gewebe auf ein Protein, *Gimap3*, zurückgeführt werden (JOKINEN et al. 2010). Während also im Blut der Mechanismus ansatzweise bekannt ist, ist dies in der Leber und Niere nicht der Fall.

Da dieses Modell das einzig gut untersuchte war, war unsicher, ob diese Segregationseffekte eine Ausnahme sind, oder sie bei einer Vermischung von „physiologischen“, also nicht pathologisch mutierten, aber genetisch unterschiedlichen mtDNAs immer auftreten. Das Hauptproblem war die geringe mtDNA-Variabilität bei Labormäusen, da sie von nur sehr wenigen Muttertieren abstammen. Um dieses Problem zu umgehen, haben wir in Zusammenarbeit mit Prof. Jaroslav PIÁLEK (Tschechische Akademie der Wissenschaften) die

mtDNA von wildlebenden Hausmäusen in Österreich, Deutschland, der Schweiz und Frankreich untersucht. Dabei konnten wir zeigen, dass in der wildlebenden Mauspopulation, wie vermutet, eine große Variabilität unter den mtDNAs herrscht, und sie, wie in Abbildung 1A zu sehen, genetisch in drei Gruppenclustern (mit der mtDNA der Subspezies *M. m. musculus* als viertem Cluster) vorkommen.

Mittels Ooplasmatransfer wurden Mitochondrien (Ooplasma) von jeweils einem Cluster in jeweils eine Eizelle der Labormaus C57BL/6N (B6) gebracht. Die vier daraus resultierenden Modelle besitzen also den Kern der B6-Maus, sind aber heteroplasmatisch ein Mix aus B6 und jeweils einer Wildmaus-mtDNA (Abb. 1B).

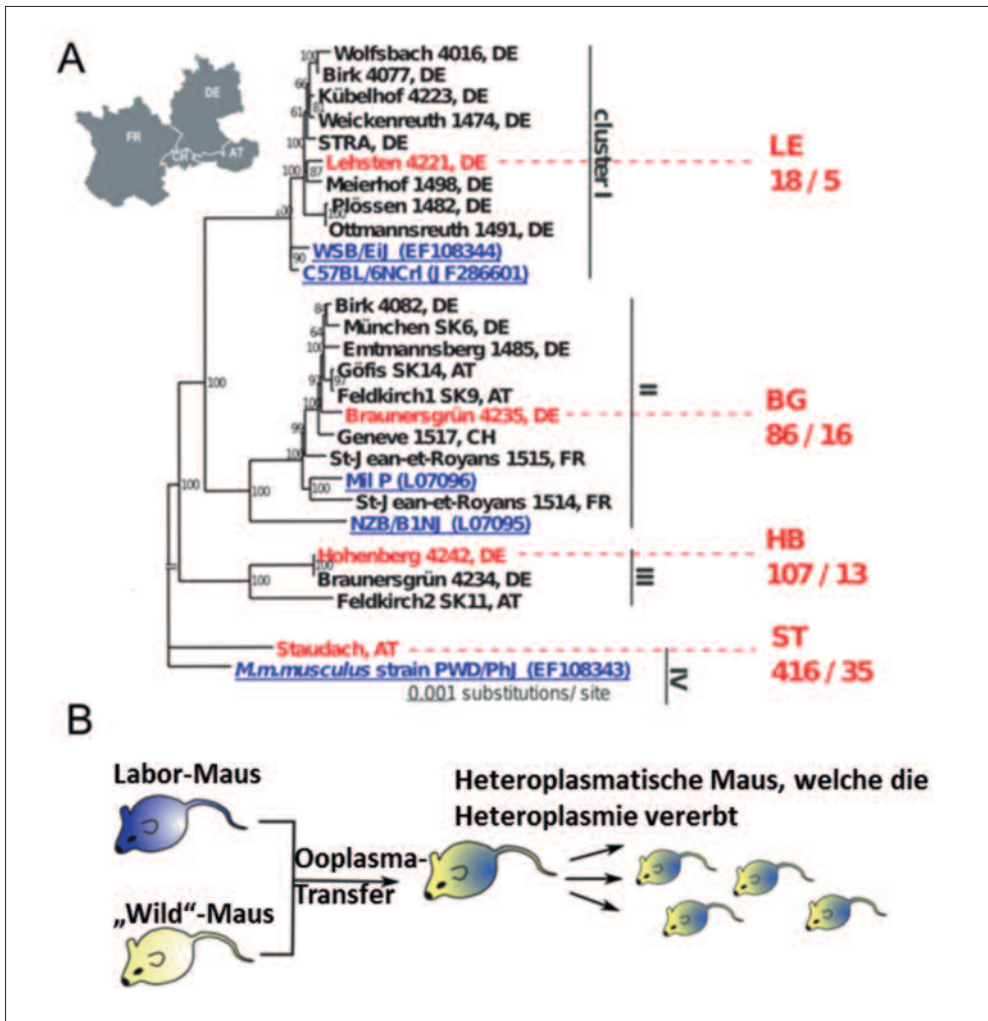


Abb. 1 Verwendung der natürlichen mtDNA-Variabilität für Mausmodelle. (A) Phylogenetische Analyse von 22 neu sequenzierten Mitogenomen. Die mtDNA von Mausstämmen, deren Ursprungstiere aus Österreich, Deutschland, der Schweiz und Frankreich stammen, wurden vollständig sequenziert. Die Genome teilen sich in vier Cluster, wobei das vierte einer anderen Subspezies (*Mus musculus musculus*) angehört. Die vier Linien, die zur Herstellung der

Diese Modelle wurden über zwei Jahre beobachtet. Es zeigte sich, dass in allen vier Modellen gewebsspezifische Segregationseffekte ähnlich denen im NZB-Modell auftraten. Interessanterweise waren diese Effekte stärker, je größer der genetische Unterschied zwischen den beiden mtDNA-Haplotypen war. Diese Daten machen es, zusammen mit dem NZB-Modell und Beobachtungen beim Rind und Schwein (Tab. 1), sehr wahrscheinlich, dass diese Effekte eher die Regel als die Ausnahme darstellen, und – da sie bei mehreren Säugtieren beobachtet wurden – auch beim Menschen auftreten könnten. Da bei verschiedenen assistierten Reproduktionstechniken im Humanbereich Ooplasma- bzw. Karyoplasttransfer eingesetzt wird, sollten diese Effekte in Zukunft berücksichtigt werden (BURGSTALLER et al. 2014).

Eine genaue Untersuchung der vier Mausmodelle zeigte unterschiedliche Segregationsmechanismen. Während sich im ST-Modell (ST) die Wildmaus-mtDNA in fast allen untersuchten Geweben durchsetzte, passierte das im BG-Modell (BG) nur in Geweben mit hohem Zellumsatz wie z. B. Darmschleimhaut, Haut und Blut. Interessanterweise wurde auch Segregation in post-mitotischem Gewebe wie Herz (HB) und Muskel (HB und ST) gefunden. Dieser Befund ist deshalb wichtig, da sich mitochondriale Erkrankungen hauptsächlich in diesen Organen zeigen und diese Effekte dadurch für die Humanmedizin relevant sind.

Noch am wenigsten untersucht ist die Kinetik mitochondrialer Segregation. Prinzipiell geht man davon aus, dass sich das Verhältnis zweier mtDNA-Typen konstant über die Zeit ändert, wie das z. B. beim humanen MELAS (*Mitochondrial Myopathy, Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like Episodes*)-Syndrom (GOTO et al. 1990) der Fall ist. Allerdings ist kontraintuitiv, dass Entwicklungsfaktoren wie Organwachstum, Stoffwechseländerungen oder Seneszenz keinen Einfluss auf Zell- oder mtDNA-Umsatz und damit auf die Segregationsrate haben sollten.

Tatsächlich finden sich in unseren Modellen drei verschiedene Segregationskinetiken. Interessanterweise alle in der Leber (Abb. 2). In den meisten Organen kam es, wie in Abbildung 2B zu sehen, zu einer konstanten Veränderung. Dies entspricht dem derzeitigen Wissensstand. Doch wurden auch zwei Kinetiken beobachtet, die, wie vermutet, mit dem Alter, genauer gesagt der Entwicklungsstufe, korrelierten. In der ersten kommt es bis zum postnatalen (P) Tag 51 ( $\pm 26$ ) zu einem starken Anstieg der Wildmaus-mtDNA, danach flacht der Anstieg ab (Abb. 2C). Das entspricht der Organogenese der Leber, in der die Zellzahl rasch bis zum P 30 zunimmt und am P 60 ein Plateau erreicht (EPSTEIN 1967, SAKATA et al. 1996). Eine ähnliche Übereinstimmung wurde auch für den Herzmuskel gefunden. In der zweiten Segregationskinetik kommt es ebenfalls zu einem starken initialen Anstieg der Wildmaus-mtDNA, jedoch flacht dieser viel später, erst um den 8. Lebensmonat, ab und wird also nicht vom Wachstum beeinflusst (Abb. 2D).

---

Mausmodelle verwendet wurden, sind rot markiert. Die Anzahl der Basenaustausche bzw. Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zu C57BL/6N ist unter der Linienabkürzung (LE, BG, HB, ST) angegeben. Blau: Labormausstämme. (B) Herstellung der heteroplasmatischen Mausmodelle. Mitochondrien (Ooplasma) von jeweils einer Maus jeden Clusters (siehe A, rot markiert) wurden in eine Eizelle der Labormaus C57BL/6N gebracht. Die daraus resultierenden vier Foundertiere (eines ist exemplarisch dargestellt) beinhalten dadurch den Zellkern von C57BL/6N und sind heteroplasmatisch mit C57BL/6N und jeweils einer Wildmaus (LE, BG, HB oder ST)-mtDNA. Die weiblichen Foundertiere vererben die Heteroplasmie auf ihre Jungtiere.

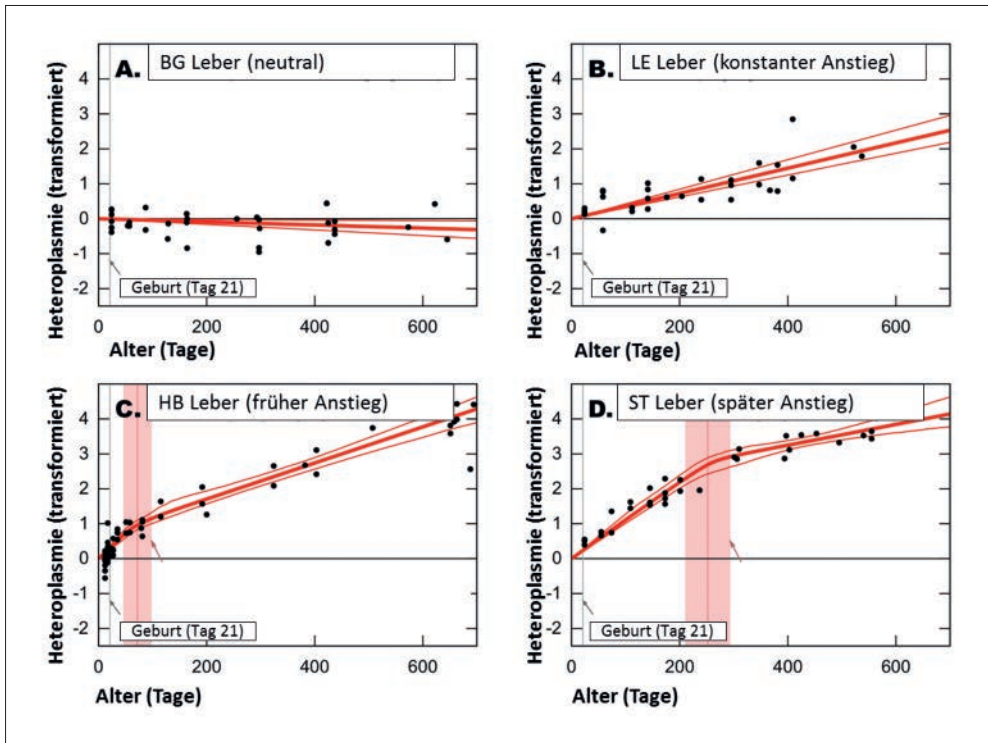


Abb. 2 Abhängigkeit der mtDNA-Segregation von Haplotyp und Alter des Tieres. Exemplarische Änderung des Verhältnisses zweier mtDNA-Haplotypen über die Zeit in der Leber der vier Mausmodelle (BG, LE, HB, ST). Die x-Achse zeigt das Alter der Maus (beginnend mit der Befruchtung), die y-Achse die mtDNA-Heteroplasmie. Jeder Punkt entspricht dem Wert einer Maus. Ein positiver Wert bedeutet Zunahme der Wildmaus-mtDNA, ein negativer Wert Zunahme der C57BL/6N-mtDNA. Während bei zwei zueinander neutralen mtDNA-Haplotypen keine Änderung über die Zeit sichtbar wird (A), nimmt bei drei Modellen die Wildmaus-mtDNA stark zu (B–D). Bei (B) ist dieser Anstieg konstant, bei (C) und (D) erfolgt er unterschiedlich lange, zuerst stark und flacht dann ab. Diese altersabhängige Änderung der Segregationsgeschwindigkeit (mit Pfeil markiert) wurde in dieser Studie erstmalig beobachtet. Modifiziert nach BURGSTALLER et al. 2014.

Eine mögliche Erklärung dafür wären Änderungen im Metabolismus alter Mäuse. Die mtDNA-Kopienzahl pro Kerngenom in der Leber nimmt ab dem 2. bis 5. Lebensmonat ab (MASUYAMA et al. 2005), was durchaus mit diesem Ergebnis korrelieren könnte. Weitere Untersuchungen sind aber notwendig, um den Mechanismus dieser Kinetiken aufzuklären.

## 7. Ausblick

Derzeit wird in der Humanreproduktion geplant, die Vererbung mtDNA-basierter Erkrankungen durch Kerntransfer (Karyoplast- oder Spindeltransfer) zu verhindern. Nach Klärung heftig diskutierter ethischer Bedenken (BAYLIS 2013, MITALIPOV und WOLF 2014) stehen diese Methoden kurz vor dem klinischen Testeinsatz. Da es dabei immer auch zu einem minimalen Ooplasmtransfer kommt, sind Tiermodelle zu diesem Thema derzeit wieder in den Fokus des Interesses gerückt. Weiterhin erleichtern die immensen Fortschritte in der Sequenzieretechnik

die Suche nach mtDNA-Mutationen und machen es damit (fast) möglich, maßgeschneiderte Mutationen *in vivo* oder *in vitro* zu finden und so neue Tiermodelle herzustellen. Dadurch wird es möglich, neue Therapieformen besser zu testen. Kombiniert man das NZB-Mausmodell mit den von uns entwickelten Modellen, gibt es fünf systematisch untersuchte, physiologische mtDNA-Kombinationen. Jede dieser Kombinationen zeigte unterschiedliche Segregationsmuster. Um auf die zugrunde liegenden Mechanismen zu kommen, wird es notwendig sein, bestimmte vermutete Einflussfaktoren, wie mtDNA-Umbau, -Metabolismus usw., gezielt zu beeinflussen und die Auswirkungen zu beobachten. Weiterhin lassen sich aus den bis jetzt verwendeten mtDNA-Haplotypen zehn neue Kombinationen herstellen, die weitere interessante Ergebnisse zeigen und damit Hinweise auf den Einfluss von mtDNA-Haplotypen auf die Segregation liefern würden.

## 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)
- AL RAWI, S., LOUVET-VALLEE, S., DJEDDI, A., SACHSE, M., CULETTO, E., HAJJAR, C., BOYD, L., LEGOUIS, R., and GALY, V.: Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* 334, 1144–1147 (2011)
- 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<sup>Tyr</sup> 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)
- BAYLIS, F.: The ethics of creating children with three genetic parents. *Reprod. Biomed. Online* 26, 531–534 (2013)
- BURGSTALLER, J. P., JOHNSTON, I. G., JONES, N. S., ALBRECHTOVA, J., KOLBE, T., VOGL, C., FUTSCHIK, A., MAYRHOFER, C., KLEIN, D., SABITZER, S., BLATTNER, M., GÜLLY, C., POULTON, J., RÜLICHE, T., PIÁLEK, J., STEINBORN, R., and BREM, G.: mtDNA segregation in heteroplasmic tissues is common *in vivo* and modulated by haplotype differences and developmental stage. *Cell Rep.* 7, 2031–2041 (2014)
- CHINNERY, P. F., JOHNSON, M. A., WARDELL, T. M., SINGH-KLER, R., HAYES, C., BROWN, D. T., TAYLOR, R. W., BINDOFF, L. A., and TURNBULL, D. M.: The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann. Neurol.* 48, 188–193 (2000)
- CUMMINS, J. M., WAKAYAMA, T., and YANAGIMACHI, R.: Fate of microinjected spermatid mitochondria in the mouse oocyte and embryo. *Zygote* 6, 213–222 (1998)
- DELUCA, S. Z., and O'FARRELL, P. H.: Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Dev. Cell* 22, 660–668 (2012)
- EPSTEIN, C. J.: Cell size, nuclear content, and the development of polyploidy in the mammalian liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 327–334 (1967)
- 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)
- FARRAR, G. J., CHADDERTON, N., KENNA, P. F., and MILLINGTON-WARD, S.: Mitochondrial disorders: aetiologies, models systems, and candidate therapies. *Trends Genet.* 29, 488–497 (2013)
- 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)
- FREYER, C., CREE, L. M., MOURIER, A., STEWART, J. B., KOOLMEISTER, C., MILENKOVIC, D., WAI, T., FLOROS, V. I., HAGSTROM, E., CHATZIDAKI, E. E., WIESNER, R. J., SAMUELS, D. C., LARSSON, N. G., and CHINNERY, P. F.: Variation in germline mtDNA heteroplasmy is determined prenatally but modified during subsequent transmission. *Nature Genet.* 44, 1282–1285 (2012)
- GILKERSON, R. W.: Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1899–1906 (2009)



- 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)
- GOTO, Y., NONAKA, I., and HORAI, S.: A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348, 651–653 (1990)
- GYLLENSTEN, U., WHARTON, D., JOSEFSSON, A., and WILSON, A. C.: Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352, 255–257 (1991)
- HILL, J. H., CHEN, Z., and XU, H.: Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. *Nature Genet.* 46, 389–392 (2014)
- 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)
- INOUE, K., NAKADA, K., OGURA, A., ISOBE, K., GOTO, Y., NONAKA, I., and HAYASHI, J. I.: Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nature Genet.* 26, 176–181 (2000)
- 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)
- 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)
- JEPPESEN, T. D., SCHWARTZ, M., FREDERIKSEN, A. L., WIBRAND, F., OLSEN, D. B., and VISSING, J.: Muscle phenotype and mutation load in 51 persons with the 3243A>G mitochondrial DNA mutation. *Arch. Neurol.* 63, 1701–1706 (2006)
- JOKINEN, R., MARTTINEN, P., SANDELL, H. K., MANNINEN, T., TEERENHOVI, H., WAI, T., TEOLI, D., LOREDO-OSTI, J. C., SHOUBRIDGE, E. A., and BATTERSBY, B. J.: Gimap3 regulates tissue-specific mitochondrial DNA segregation. *PLoS Genet.* 6, e1001161 (2010)
- KUKAT, C., WURM, C. A., SPAHR, H., FALKENBERG, M., LARSSON, N. G., and JAKOBS, S.: Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 13534–13539 (2011)
- LI, F. Y., CUDDON, P. A., SONG, J., WOOD, S. L., PATTERSON, J. S., SHELTON, G. D., and DUNCAN, I. D.: Canine spongiform leukoencephalomyelopathy is associated with a missense mutation in cytochrome b. *Neurobiol. Dis.* 21, 35–42 (2006)
- LIN, C. S., SHARPLEY, M. S., FAN, W., WAYMIRE, K. G., SADUN, A. A., CARELLI, V., ROSS-CISNEROS, F. N., BACIU, P., SUNG, E., MCMANUS, M. J., PAN, B. X., GIL, D. W., MACGREGOR, G. R., and WALLACE, D. C.: Mouse mtDNA mutant model of Leber hereditary optic neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 20065–20070 (2012)
- LUO, S. M., GE, Z. J., WANG, Z. W., JIANG, Z. Z., WANG, Z. B., OUYANG, Y. C., HOU, Y., SCHATTEEN, H., and SUN, Q. Y.: Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 13038–13043 (2013)
- MANWARING, N., JONES, M. M., WANG, J. J., ROCHTCHINA, E., HOWARD, C., MITCHELL, P., and SUE, C. M.: Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. *Mitochondrion* 7, 230–233 (2007)
- MASUYAMA, M., IIDA, R., TAKATSUKA, H., YASUDA, T., and MATSUKI, T.: Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1723, 302–308 (2005)
- MATHEWS, C. E., MCGRAW, R. A., and BERDANIER, C. D.: A point mutation in the mitochondrial DNA of diabetes-prone BHE/cdb rats. *FASEB J.* 9, 1638–1642 (1995)
- MITALIPOV, S., and WOLF, D. P.: Clinical and ethical implications of mitochondrial gene transfer. *Trends in Endocrinol. Metab.* 25, 5–7 (2014)
- 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)
- PAYNE, B. A., WILSON, I. J., YU-WAI-MAN, P., COXHEAD, J., DEEHAN, D., HORVATH, R., TAYLOR, R. W., SAMUELS, D. C., SANTIBANEZ-KOREF, M., and CHINNERY, P. F.: Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA. *Hum. Mol. Genet.* 22, 384–390 (2013)
- POULTON, J., CHIARATTI, M. R., MEIRELLES, F. V., KENNEDY, S., WELLS, D., and HOLT, I. J.: Transmission of mitochondrial DNA diseases and ways to prevent them. *PLoS Genet.* 6 (2010)
- 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)



- SAKATA, H., TAKAYAMA, H., SHARP, R., RUBIN, J. S., MERLINO, G., and LAROCHELLE, W. J.: Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ.* 7, 1513–1523 (1996)
- SATO, M., and SATO, K.: Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* 334, 1141–1144 (2011)
- SCHWARTZ, M., and VISSING, J.: Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New Engl. J. Med.* 347, 576–580 (2002)
- SHARPLEY, M. S., MARCINIAK, C., ECKEL-MAHAN, K., MCMANUS, M., CRIMI, M., WAYMIRE, K., LIN, C. S., MASUBUCHI, S., FRIEND, N., KOIKE, M., CHALKIA, D., MACGREGOR, G., SASSONE-CORSI, P., and WALLACE, D. C.: Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell* 151, 333–343 (2012)
- SHITARA, H., KANEDA, H., SATO, A., INOUE, K., OGURA, A., YONEKAWA, H., and HAYASHI, J. I.: Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics* 156, 1277–1284 (2000)
- SHOUBRIDGE, E. A.: Mitochondrial DNA segregation in the developing embryo. *Hum. Reprod.* 15/Suppl. 2, 229–234 (2000)
- SONDHEIMER, N., GLATZ, C. E., TIRONE, J. E., DEARDORFF, M. A., KRIEGER, A. M., and HAKONARSON, H.: Neutral mitochondrial heteroplasmy and the influence of aging. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1653–1659 (2011)
- ST JOHN, J., SAKKAS, D., DIMITRIADI, K., BARNES, A., MACLIN, V., RAMEY, J., BARRATT, C., and DE JONGE, C.: Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet* 355, 200 (2000)
- STEINBORN, R., SCHINOGL, P., ZAKHARTCHENKO, V., ACHMANN, R., SCHERNTHANER, W., STOJKOVIC, M., WOLF, E., MÜLLER, M., and BREM, G.: Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nature Genet.* 25, 255–257 (2000)
- STEWART, J. B., FREYER, C., ELSON, J. L., WREDENBERG, A., CANSU, Z., TRIFUNOVIC, A., and LARSSON, N. G.: Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biol.* 6, e10 (2008)
- SUTOVSKY, P., MORENO, R. D., RAMALHO-SANTOS, J., DOMINKO, T., SIMERLY, C., and SCHATTEN, 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)
- 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)
- TYYNISMAA, H., and SUOMALAINEN, A.: Mouse models of mitochondrial DNA defects and their relevance for human disease. *EMBO Rep.* 10, 137–143 (2009)
- 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)
- WALLACE, D. C.: Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482–1488 (1999)
- WALLACE, D. C., and CHALKIA, D.: Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a021220 (2013)

Dr. Jörg BURGSTALLER  
Institut für Tierzucht und Genetik  
Department für Biomedizinische Wissenschaften  
Veterinärmedizinische Universität Wien  
Veterinärplatz 1  
1210 Wien  
Österreich  
Tel.: +43 2272 66280607  
Fax.: +43 2272 66280603  
E-Mail: joerg.burgstaller@vetmeduni.ac.at

## **Risiko: Erkundungen an den Grenzen des Wissens**

Leopoldina-Meeting am 15. und 16. Juni 2012 in Bonn

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 117, Nr. 397

Herausgegeben von Hans-Georg Bohle (†), Jürgen Pohl (†) und  
Wolf Dieter Blümel (Stuttgart)

(2014, 169 Seiten, 16 Abbildungen, 4 Tabellen, 22,95 Euro,

ISBN 978-3-8047-3270-4)

Intuitiv weiß ein jeder, was ein Risiko ist, aber man tut sich schwer, wenn man das Phänomen genau fassen möchte, denn es hat sehr viele Facetten. Der Risikobegriff hat in den letzten Jahrzehnten eine große Karriere gemacht. Das Thema „Risiko“ ist jedoch so alt wie die Menschheit selber. Es begleitet das Leben jedes Einzelnen wie auch das von Gruppen oder ganzen Staatengemeinschaften. Der Band mit den Beiträgen des Leopoldina-Meetings „Risiko: Erkundungen an den Grenzen des Wissens“ offenbart die Spannweite und Komplexität des Begriffs *Risiko*: Mag sich das Leben mit dem Risiko, mit dem unbekanntem Wagnis, mit der unbedachten Gefahr in den frühen Jäger- und Sammler-Kulturen noch auf die Abhängigkeit von einer nur bedingt einzuschätzenden natürlichen Umwelt beschränkt haben, so hat sich dies mit der zunehmenden zivilisatorischen und technischen Entwicklung außerordentlich erweitert: Der von Nobelpreisträger Paul CRUTZEN eingeführte Begriff des *Anthropozäns* für den gegenwärtigen, erdgeschichtlich jüngsten Zeitraum beschreibt allzu deutlich, wie stark sich der Mensch als Gestalter und Veränderer seines regionalen wie globalen Lebensraumes von der Natur zu emanzipieren versucht. Die Beiträge vermitteln verschiedene Zugänge zum Thema *Risiko*, die den Problembereich der Politik- und Gesellschaftsberatung erschließen.

## **Mutante Modelle und Erbfehler – das Janus-Gesicht der Signalübertragung (Zusammenfassung)**

Mathias MÜLLER ML (Wien)

Jaks (Janus-Kinasen) und Stats (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) bilden ein schnell agierendes Zwei-Komponenten-Signaltransduktionsmodul zur Kommunikation zwischen der Zelloberfläche und den Genen des Zellkerns. Diese lineare oder kanonische Jak-Stat-Signaltransduktion wird von einem breiten Spektrum an Zytokin- und Wachstumsfaktorrezeptoren der Zelloberfläche verwendet. Dementsprechend besitzen Jaks und Stats besondere Bedeutung hinsichtlich der korrekten Entwicklung und einwandfreien Funktion von Organismen. Teilweiser oder vollständiger Verlust und Fehlfunktion von Jak-Stat-Aktivitäten führt zu ernststen Folgeerscheinungen wie z. B. Entwicklungs- und Immundefekten, entzündlichen Erkrankungen, metabolischen Störungen oder Krebsentstehung.

Der vom Wissenschaftsfonds FWF geförderte Sonderforschungsbereich (SFB) „JakStat“ vereint sechs Forschergruppen der Veterinärmedizinischen Universität Wien, der Universität Wien, der Österreichischen Akademie der Wissenschaften und der Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft. Der Sonderforschungsbereich (SFB) „JakStat“ ist in die drei Forschungsbereiche

- Infektion und Immunität,
- Hämatopoetische Entartungen und Tumorimmunüberwachung sowie
- Kanonische und Nicht-kanonische Mechanismen der Jak-Stat-Aktivität organisiert.

Gemeinsam untersucht der SFB Folgeerscheinungen von Jak-Stat-Defekten *in vivo* in mutanten Mausmodellen im Vergleich zu Patientenproben und zeigt deren mechanistische und/oder zelluläre Ursachen auf. Die Forschung konzentriert sich auf Stat1 und Tyk2 in Infektionserkrankungen, Tumorüberwachung, Leukämieentstehung und nicht-kanonischen Mechanismen und auf Stat5 und Jak2 in hämatopoetischen Entartungen. Die gemeinsamen Forschungsziele werden durch eine übergreifende SFB-Struktur zur Organisation zentraler Plattformen für Versuchstierzucht und -haltung, anspruchsvolle Zellkulturtechniken, Bioinformatik und *Next-Generation*-Sequenzierung, externe und interne Kommunikation sowie von Maßnahmen zur Förderung der Karrieren junger SFB-Mitarbeiterinnen und -Mitarbeiter unterstützt.

Die Jak-Stat-Signalübertragung ist evolutionär hoch konserviert und spielt daher auch in veterinär-relevanten Spezies eine zentrale Rolle. Daher ist forschungsgeleitete Lehre mit dem Fokus Jak-Stat nachhaltig im Entwicklungsplan der Vetmeduni verankert und kann im Rahmen

*Mathias Müller*

der Krankheitsbekämpfung und des Leistungserhalts von Begleit- und Nutztieren studiert werden.

O. Univ.-Prof. Dr. Mathias MÜLLER  
Abteilung für molekulare Genetik  
Institut für Tierzucht und Genetik  
Veterinärmedizinische Universität Wien  
Veterinärplatz 1  
1210 Wien  
Österreich  
Tel.: +43 1 250775620  
Fax: +43 1 250775690  
E-Mail: mathias.muller@vetmeduni.ac.at



**ISSN: 0369-5034**

**ISBN: 978-3-8047-3414-2**