

QTL-Kartierung und
funktionelle Kandidatengenanalyse
für das Merkmal Totgeburt
in einer fortgeschrittenen
Fleckvieh- x Red-Holstein-Rückkreuzungspopulation

Verena Gomeringer

Aus dem Institut für Tierzucht
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Martin Förster

QTL-Kartierung und
funktionelle Kandidatengenanalyse
für das Merkmal Totgeburt
in einer fortgeschrittenen
Fleckvieh- x Red-Holstein-Rückkreuzungspopulation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Verena Gomeringer
aus
Sigmaringen

München 2007

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Prof. Dr. Förster

Koreferent: Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Meiner Familie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 DNA-Marker.....	2
2.1.1 Mikrosatelliten	2
2.1.2 SNPs	3
2.2 QTL-Kartierung	3
2.2.1 Quantitative trait locus (QTL).....	3
2.2.2 Anwendungsbereiche und Nutzen der Kartierung von QTL	3
2.2.3 Familiendesigns und QTL-Kartierung	4
2.2.3.1 Daughter Design	4
2.2.3.2 Selektives DNA Pooling	4
2.2.3.3 Granddaughter Design.....	5
2.2.3.4 Komplexes Pedigree Design.....	5
2.2.4 Vorgehensweise bei der QTL-Kartierung	6
2.2.4.1 Genomweiter Scan und Kopplungsanalyse.....	6
2.2.4.2 QTL-Feinkartierung.....	7
2.2.5 Identifizierung von Kandidatengenen	8
2.2.5.1 Positionelle Kandidatengenanalyse	9
2.2.6 Markergestützte Selektion	9
2.3 Totgeburt und Kalbeverlauf	10
2.3.1 Die Totgeburt als Merkmal in der Zuchtwertschätzung	10
2.3.2 Genetische Parameter, Interaktionen und Faktoren, die Totgeburt betreffend	11
2.3.3 Das Kalb als Ursache der Schwer- und Totgeburt	15
2.3.4 Die Kuh als Ursache der Schwer- und Totgeburt	15
2.3.5 Das „Large Offspring Syndrome“	16
2.3.6 QTL-Kartierungen für Tot- und/oder Schweregeburt	18
3 MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Probenmaterial	20
3.1.1 Auswahl der Versuchstiere und verwendete Familiendesigns	20
3.1.1.1 Wichtige Founder-Tiere und deren Nachkommen in der Fleckvieh-Population	20
3.1.1.2 Vorangegangener Scan mit überlappenden Granddaughter Designs	21
3.1.1.3 Daughter Design (18DD)	23

3.1.1.4	Komplexes 6-Generationen Pedigree (6GP).....	24
3.1.1.5	Granddaughter Design zur Feinkartierung (11GDD).....	26
3.1.1.6	Komplexer Pedigree aus 11GDD (CPD)	26
3.2	Material	27
3.2.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers	27
3.2.2	Lösungen und Puffer.....	28
3.2.3	Verbrauchsmaterial.....	28
3.2.4	Geräte	29
3.2.5	Software	30
3.3	Molekularbiologische Methoden	31
3.3.1	Herstellung von Lysaten und Isolation von DNA	31
3.3.1.1	Lysatherstellung aus Vollblut	31
3.3.1.2	DNA-Präparation aus Vollblut mit kommerziellen Kits.....	31
3.3.1.3	Lysatherstellung aus Haarwurzeln.....	32
3.3.1.4	Selektives DNA-Pooling aus Milchproben	32
3.3.1.5	DNA-Präparation aus Milchpools mit kommerziellen Kits	33
3.3.1.6	DNA-Isolation aus Rindersperma	34
3.3.2	Auswahl und Suche geeigneter Mikrosatelliten-Marker.....	35
3.3.2.1	Suche von Mikrosatelliten in Markerkarten und Primer-Design.....	35
3.3.2.2	Suche von Mikrosatelliten aus Genomsequenzen in Internet-Datenbanken und Positionsbestimmung in der Markerkarte	36
3.3.2.3	PCR mit einzelnen Mikrosatelliten-Primern	36
3.3.2.4	Zusammenstellung der Marker in Multiplex-PCRs	37
3.3.3	Gelelektrophoretische Typisierung fluoreszenzmarkierter Mikrosatelliten	41
3.3.3.1	Agarosegel.....	41
3.3.3.2	ABI310	41
3.3.3.3	ABI377	41
3.4	Biometrische und statistische Methoden	42
3.4.1	Zuchtwerte und Phänotypen	42
3.4.1.1	Berechnung der Zuchtwerte für Totgeburt.....	42
3.4.1.2	Berechnung der Zuchtwerte für Milchleistungsmerkmale.....	42
3.4.2	Programme zur Interpretation und Auswertung der Daten	43
3.4.2.1	Haplotypenanalyse	43
3.4.2.2	Test auf Kopplung zwischen Marker und QTL beim selektiven DNA-Pooling und Approximative Interval Mapping.....	44
3.4.2.3	Intervallkartierung in den Granddaughter Designs	45
3.4.2.4	Kombinierte Linkage Disequilibrium und Linkage Analyse mit „random walk approach“ und „meiosis Gibbs sampling“	46
3.4.2.5	Kombinierte Linkage Disequilibrium und Linkage Analyse.....	46

4	ERGEBNISSE	48
4.1	BTA09	49
4.1.1	QTL-Kartierung für paternale Totgeburt und paternaler Kalbeverlauf	49
4.1.1.1	Erster Scan für paternale Totgeburt und paternalen Kalbeverlauf	49
4.1.1.2	Haplotypisierung des Kernpedigrees auf BTA09	50
4.1.1.3	Intervallkartierung mit 26 Familien aus 2GDDscan und 11GDD	52
4.1.1.4	Feinkartierung für die Merkmale TGp und KVp mit 11GDD	56
4.1.2	QTL-Kartierung für Proteinprozent	68
4.1.2.1	Erster Scan für Proteinprozent	68
4.1.2.2	Auswertungen der „selective DNA pools“	70
4.1.2.3	Feinkartierung für das Merkmal Proteinprozent	73
4.1.3	Kandidatengenanalyse	79
4.2	BTA29	82
4.2.1	Marker	82
4.2.2	Intervallkartierung auf BTA29	84
5	DISKUSSION	86
5.1	BTA09	86
5.1.1	QTL für die Merkmale Totgeburt und Kalbeverlauf paternal	86
5.1.1.1	Auswertungen der LDL-Kartierung für KVp und TGp	88
5.1.2	IGF2R als mögliches Kandidatengen für KVp und TGp auf BTA09	89
5.1.2.1	Parentales Imprinting bei IGF2R	89
5.1.3	QTL mit Effekt auf das Merkmal Proteinprozent auf BTA09	92
5.1.3.1	Ergebnisse der LDL-Kartierung bei PP	93
5.1.4	Kandidatengene für das Merkmal Proteinprozent	94
5.2	BTA29	96
5.2.1	Totgeburt und Kalbeverlauf paternal	96
5.2.1.1	IGF2	96
5.2.2	Milchmenge und Milchhaltsstoffe	97
5.3	Abschließende Bemerkungen	98
6	ZUSAMMENFASSUNG	100
7	SUMMARY	101
8	LITERATURVERZEICHNIS	102

Abkürzungsverzeichnis

11GDD	Granddaughter-Design aus 11 Familien
18DD	Daughter-Design aus 18 Familien
6GP	komplexes 6-Generationen-Pedigree
AIM	Approximative Interval Mapping
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLUP	Best Linear Unbiased Prediction
BOKU	Universität für Bodenkultur, Wien
bp	Basenpaare, basepairs
BTA	Bos Taurus Autosome
CEp	Calving Ease paternal, paternaler Kalbeverlauf
cM	centiMorgan
CPD	Complex Pedigree Design
cSNP	coding Single Nucleotide Polymorphism
DD	Daughter Design
DFV	Deutsches Fleckvieh
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DYD	Daughter Yield Deviation, Töchterabweichung
eBV	estimated Breeding Value (geschätzter Zuchtwert)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Einmerkmalsmodell-Zuchtwert, alle Abkalbungen
EM1	Einmerkmalsmodell-Zuchtwert, 1. Abkalbung
EM2	Einmerkmalsmodell-Zuchtwert, 2. Abkalbung
EMM	Einmerkmalsmodell-Zuchtwert
EPD	expected progeny difference
ER1 / ESR1	Estrogen Receptor 1 (ER α)
ET	Embryotransfer
Fam	6-Carboxyfluorescein
FEm	Fertility maternal, maternale Fruchtbarkeit
FEp	Fertility paternal, paternale Fruchtbarkeit
FP	Fettprozent

FV	Fleckvieh
FW	Fleischwert
FY	Fat Yield, Fettmenge
GAS	Gene Assisted Selection (gengestützte Selektion)
GDD	Granddaughter Design
GDDscan	Granddaughter-Design aus früheren Scans
GRM	Genotype Relationship Matrix
Hex	4,7,2,4',5',7'-Hexachloro-6-carboxyfluorescein
HF	Holstein-Friesian-Rind
IBD	Identity-by-Descent (identisch durch Abstammung)
IGF2	insuline-like growth factor 2
IGF2R	insuline-like growth factor 2 receptor
IM	Interval Mapping (Intervallkartierung)
IVF	In Vitro Fertilization
KB	künstliche Besamung
KVm	Kalbeverlauf maternal
KVp	Kalbeverlauf paternal
kZW	korrigierter Zuchtwert
LD	Linkage Disequilibrium
LDL	Linkage Disequilibrium / Linkage
LE	Linkage Equilibrium
LKV	Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung, Bayern
LOD	Logarithm of Odds
LOS	Large Offspring Syndrome
LR	Likelihood Ratio
MAS	Marker Assisted Selection (markergestützte Selektion)
mat	maternal
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MMM	Mehrmerkmalsmodell-Zuchtwert (Achtmerkmalsmodell)
MTZB	Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie
MV	Milk value (Milchwert)
MY	Milk Yield (Milchmenge)
NR56	Non Return Rate, 56 Tage
NT	Nuclear Transfer

pat	paternal
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PP	Proteinprozent
PR	Progesterone Receptor
PY	Protein Yield (Proteinmenge)
QTL	Quantitative Trait Locus
RH	Holstein-Friesian, roter Schlag (Red Holsteins)
RP	Ressource-Population
SBm	Stillbirth maternal, maternale Totgeburt
SBp	Stillbirth paternal, paternale Totgeburt
SCNT	Somatic Cell Nuclear Transfer
SDP	Selektives DNA Pooling
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STR	Short Tandem Repeats
Tamra	N,N,N',N'-Tetrachloro-6-carboxyfluorescein
Tet	4,7,2',7'-Tetrachloro-6-carboxyfluorescein
TGm	Totgeburt maternal
TGp	Totgeburt paternal
wgs	whole genome shotgun
YAC	Yeast Artificial Chromosome
ZW	Zuchtwert
ZWk	Zuchtwert, korrigiert

1 Einleitung

Während der letzten Jahre gewann die Selektion auf Fitness, Langlebigkeit bzw. Nutzungsdauer und Leichtkalbigkeit in der Rinderzucht sowohl aus ethisch-tierschützerischen, als auch aus wirtschaftlichen Gründen immer mehr an Bedeutung.

Während der letzten 25 Jahre konnte man einen deutlichen Anstieg der Totgeburtenrate beim Fleckvieh von 4,5% auf bis zu 7,2% verzeichnen. In anderen Rassen, die auch der intensiven Selektion auf Milchleistung und Milchinhaltsstoffe unterliegen, stieg die Totgeburtenrate ebenfalls (z.B. von 5,5% auf 12,2% bei Red-Holsteins). Dystokie (erschwerter Geburtsverlauf) wird als eine der Hauptursachen für Totgeburten angenommen.

Totgeburten bedeuten für die Landwirte neben dem Aspekt der Tiergesundheit und des Tierschutzes nicht zu unterschätzende finanzielle Einbußen bzw. einen finanziellen Mehraufwand: Kosten für tierärztliche Leistungen, den Verlust des Kalbes als eine potentiell gute Milchkuh, Verlust des Schlachtwertes eines Masttieres und eventuelle Ausgaben für die Remontierung oder Ankauf eines adäquaten Tieres zur Ausnutzung vorhandener Platz- und Fütterungskapazitäten.

Schwere Verletzungen des Geburtsweges oder sogar Tod der Mutterkuh durch erschwerte Geburten sind darüber hinaus nicht selten und schlagen in erhöhten Tierarztkosten, Rückgang der Milchleistung, verminderter Fruchtbarkeit oder sogar vollständigem Abgang des Tieres zu Buche.

Ziel dieser Arbeit war es, einen QTL für paternale Totgeburt bzw. paternalen Kalbeverlauf in der Fleckviehpopulation zu kartieren und mögliche Kandidatengene zu evaluieren.

2 Literaturübersicht

2.1 DNA-Marker

2.1.1 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten, auch short tandem repeats (STR) oder simple sequence repeats (SSR) genannt, sind hoch polymorphe, anonyme DNA-Marker und aufgrund ihrer gleichmäßigen Verteilung über das gesamte Genom sehr gute genetische Marker für die Kopplungsanalyse (Butler, 2005; Ihara et al., 2004). Mikrosatelliten sind kurze repetitive Sequenzen von 2 bis 6 Basenpaaren, die sich in der gleichen Reihenfolge bis zu 25 Mal wiederholen, aber dennoch klein genug für die Amplifikation mittels PCR sind (Butler, 2005; Holtkemper et al., 2001; Pompanon et al., 2005). STRs finden als genetische Marker in Studien der Populationsgenetik, bei Krankheitskartierungen, zur Abstammungskontrolle oder als genetischer Fingerabdruck in der Forensik Verwendung (Butler, 2005; Pompanon et al., 2005; Ruitberg et al., 2001). Ein Vorteil von STRs ist die Möglichkeit der simultanen Amplifikation mehrerer Markerregionen als Multiplex-PCR (Butler, 2005) und gute Ergebnisse mit kleinsten Mengen an DNA, was z.B. in der Forensik von großer Bedeutung ist (Ruitberg et al., 2001). Eine große Anzahl an polymorphen Allelen bei verschiedenen Individuen entsteht durch eine unterschiedliche Anzahl repetitiver Sequenzen (Schmalzing et al., 1997). Diese unterschiedliche Anzahl entsteht durch „Strand slippage“, einem Fehler der Polymeraseaktivität (Holtkemper et al., 2001) und resultiert in einer Mutation (single-step, double-step, multistep mutation) (Brinkmann et al., 1998), welche eine Variation der STR-Länge bedingt.

Wichtig für eine gut funktionierende PCR und eine genaue Genotypisierung von Mikrosatelliten sind eine gute DNA-Qualität, einwandfreie Reagenzien und ein funktionierendes Probenmanagement, um Verwechslungen zu vermeiden. Schlechte Proben sowie Reagenzien von minderer Qualität können Fehler in der Genotypisierung von Mikrosatelliten verursachen. Es kann zu „allelic dropouts“, also zur Nichtamplifikation des meist längeren Allels kommen, versehentliche Genotypisierung von Artefakten begünstigen und andere Fehler bei der Elektrophorese und Genotypisierung verursachen (Pompanon et al., 2005).

2.1.2 SNPs

Polymorphismen in der Genomsequenz an einzelnen Nukleotidpositionen werden „single nucleotide polymorphisms“ oder SNPs genannt. SNPs treten etwa alle 1000 Basen auf und werden dann als polymorph bezeichnet, wenn die Frequenz der häufigeren Variante weniger als 99% beträgt (Landegren et al., 1998). SNPs in codierenden Regionen des Genoms (cSNPs) können durch den Basenaustausch die Aminosäuresequenz des codierenden Proteins verändern und dadurch die Ursache eines neuen Phänotyps bzw. einer Krankheit sein (Cargill et al., 1999; Landegren et al., 1998).

SNPs als biallele genetische Marker haben den Vorteil, dass sie in einer höheren Anzahl im Genom vorkommen und relativ geringe Mutationsraten aufweisen, wodurch SNPs stabiler sind als STRs (Landegren et al., 1998). Diese Stabilität ist vor allem bei der Feinkartierung durch Linkage Disequilibrium von großem Nutzen.

2.2 QTL-Kartierung

2.2.1 Quantitative trait locus (QTL)

Ein QTL (Quantitative trait locus) ist ein Segment genomischer DNA, das ein oder mehrere Gene beinhaltet, welches ein quantitatives Merkmal beeinflusst (Andersson, 2001; Geldermann, 1975). Die meisten quantitativen Merkmale werden also von einer unbekanntem Zahl an QTL bzw. Genen beeinflusst (polygene Merkmale). Herauszufinden, ob ein Phänotyp aus einem oder mehreren Genen besteht, ist noch eine der schwierigeren Aufgaben in der quantitativen Genetik (Tanksley, 1993). Die Natur der zugrunde liegenden Gene und ihre molekulare Struktur ist ebenfalls noch zum größten Teil unbekannt (Andersson, 2001; Schrooten et al., 2000). Viele QTL bewirken oft nur einen schwach wahrzunehmenden phänotypischen Effekt und die Mutationen, die den QTL verursachen, sind oft schwer von neutralen phänotypischen Polymorphismen zu unterscheiden (Andersson und Georges, 2004)

2.2.2 Anwendungsbereiche und Nutzen der Kartierung von QTL

Die QTL-Kartierung befasst sich mit der Suche nach einem DNA-Segment bzw. Genen mit Effekten auf ein bestimmtes Merkmal auf dem Genom. Viele QTL

beeinflussen eine große Variation an Phänotypen, wie Wachstum, Fruchtbarkeit und Körperbau, sowie andere Merkmale von wirtschaftlichem Interesse wie z.B. Milchleistungsmerkmale bei Rindern (Andersson und Georges, 2004; Bennewitz et al., 2003; Lynch und Walsh, 1998). Bei der QTL-Kartierung werden Assoziationen bestimmter DNA-Marker (z.B. Mikrosatelliten) mit Ausprägungen bestimmter phänotypischer Merkmale in einem geeigneten Tiermaterial genomweit gesucht (Flint und Mott, 2001; Wolf, 2005). QTL werden gesucht und kartiert um die Mechanismen individueller Gene und Geninteraktionen besser verstehen zu können, realistische Modelle phänotypischer Variationen aufzustellen und Antworten auf Selektions- und evolutionäre Prozesse zu erhalten. Auch für Zuchtprogramme mit integrierten Markerinformationen wie die markergestützte Selektion (marker assisted Selection, MAS), die ein wirkungsvolles Mittel zur Introgression gewünschter Gene und besseren Selektion darstellt (Kashi et al., 1990; Schrooten et al., 2000), ist die QTL-Kartierung von großem Wert (Visscher, 2003). Die QTL-Kartierung hat das positionelle Klonen, das für eine Vielzahl für Erbkrankheiten des Menschen verfügbar ist, mit möglich gemacht (Visscher, 2003).

2.2.3 Familiendesigns und QTL-Kartierung

2.2.3.1 Daughter Design

Beim Daughter Design (DD) werden die Töchter eines Bullen genotypisiert und phänotypisiert. Die statistische Mächtigkeit des DD wächst mit der Anzahl der Töchter pro Bulle (Weller et al., 1990). Die Kosten für eine ausreichende Anzahl an Proben und Genotypen für eine genügend große statistische Mächtigkeit sind beim DD relativ hoch (Darvasi und Soller, 1994).

2.2.3.2 Selektives DNA Pooling

Das selektive DNA-Pooling wurde aus dem Daughter Design entwickelt um die Kosten und Zahl der Genotypisierungen zu reduzieren (Lipkin et al., 1998). Dabei werden nur die phänotypischen Extreme der Individuen genotypisiert (Darvasi und Soller, 1992, 1994; Lipkin et al., 1998). Das selektive DNA-Pooling ist eine Kombination aus DNA-Pooling und selektivem Genotypisieren. Es werden Individuen

mit beiden extremen phänotypischen Werten in entsprechenden Pools zusammengefasst und die Banden der Allele densitometrisch erfasst. Die Kopplung zwischen einem QTL und den Markern wird durch Ermittlung von relativen Allelfrequenzen und Verteilung der paternalen Allele in beiden Pools festgestellt (Darvasi und Soller, 1994; Mosig et al., 2001). Die Schätzung der Allelfrequenzen muss wegen Anwesenheit von Schatten- oder Stotterbanden (Artefakte von PCR-Produkten) auf diese korrigiert werden. Lipkin et. al. zeigten 1998, dass diese Stotterbanden eine lineare Funktion aufweisen, auf die problemlos korrigiert werden kann. Mosig et. al. beschrieben 2001 eine Methode, die mit einem Einzelmarker-Test und individuellen Genotypen die densitometrischen Fehler korrigiert (*Adjusted false discovery rate*) und führten mit dieser Methode QTL-Kartierungen für Protein-Prozent bei Holstein-Rindern in Israel durch.

2.2.3.3 Granddaughter Design

Beim Granddaughter Design (GDD) werden die Söhne (sons) eines Bullen (grandsire) genotypisiert und die quantitativen Merkmale, also die Phänotypen, der Enkeltöchter (granddaughters) betrachtet. Die statistische Mächtigkeit des GDD steigt mit der Anzahl an genotypisierten Söhnen. Der Vorteil des GDD besteht darin, dass für die gleiche statistische Mächtigkeit weniger Individuen genotypisiert werden müssen und somit weniger Proben, Zeit und Geld in Anspruch genommen wird (Weller et al., 1990).

In der Rinderzucht wird die QTL-Kartierung durch das GDD mittlerweile für viele Merkmale sehr erfolgreich eingesetzt (Ashwell et al., 2004; Ashwell et al., 2005; Bennewitz et al., 2003; Georges et al., 1995; Kühn et al., 2003; Olsen et al., 2002; Plante et al., 2001; Schrooten et al., 2000; Zhang et al., 1998).

2.2.3.4 Komplexes Pedigree Design

Komplexe Pedigrees bringen im Gegensatz zu Kernfamilien, bei denen nur Eltern und Nachkommen berücksichtigt werden, ein beachtliches Mehr an statistischer Mächtigkeit bei genomweiten Scans (Hayes et al., 2005). Ausgedehnte Pedigrees mit verzweigten und weitläufigen Verwandtschaftsbeziehungen über mehrere Generationen hinweg lassen mehr Rekombinationen, Berechnungen und IBD-Schätzungen pro QTL-Allel zu, fehlende Markergenotypen reduzieren jedoch die

statistische Power des Designs. Untersuchungen in komplexen Pedigrees wurden mit Regressionsanalysen, Varianzkomponentenanalysen und Maximum-Likelihood-Analysen durchgeführt (George et al., 2000; Hayes et al., 2005; Hoeschele et al., 1997; Visscher, 2003).

2.2.4 Vorgehensweise bei der QTL-Kartierung

2.2.4.1 Genomweiter Scan und Kopplungsanalyse

Die Abdeckung des Genoms mit zahlreichen anonymen Markern und anschließender Kopplungsanalyse (Olsen et al., 2004) zum Auffinden mehrerer QTL, wie z.B. QTL für Fruchtbarkeit, Milchproduktions-, Gesundheitsmerkmale oder Merkmale das Exterieur betreffend, wird von einigen Autoren als „genomewide scan“ oder „whole genome scan“ bezeichnet. Es befinden sich dabei mehrere Marker in relativ regelmäßigen Abständen auf jedem Chromosom (Ashwell et al., 2004; Ashwell et al., 2005; Hiendleder et al., 2003; Kühn et al., 2003; Mosig et al., 2001; Olsen et al., 2002; Schrooten et al., 2000; Thomsen et al., 2001; Zhang et al., 1998).

Signifikante Unterschiede zwischen den Phänotypen von Tiergruppen, die unterschiedliche Markerallele vom gemeinsamen, für einen für den QTL heterozygoten, Vater geerbt haben, weisen auf eine Kopplung zwischen Marker und einem QTL für ein bestimmtes Merkmal hin (Georges et al., 1995; Olsen et al., 2004). Je nach Abdeckung des Genoms und Zielsetzung des Projekts können Markerdichte und damit der durchschnittliche Markerabstand variieren (z.B. 406 Marker bei Ashwell et al., 2004, 264 Marker bei Kühn et al., 2003 und Hiendleder et al., 2003; 138 Marker bei Mosig et al., 2001 und 277 Marker bei Schrooten et al., 2000).

Durch relativ große Markerintervalle oder verhältnismäßig wenige Rekombinationen zwischen dichteren Markern ist die Genauigkeit der Kopplungsanalysen oft recht gering (Meuwissen und Goddard, 2000), das Vertrauensintervall (confidence interval) für die wahrscheinlichste QTL-Position liegt oft zwischen 10 und 30 cM. Die Kopplungsanalyse eignet sich sehr gut für genomweite Scans, ist aber aufgrund der großen Regionen, in denen der QTL liegen könnte, ungeeignet für eine Feinkartierung (Lee und van der Werf, 2004; Meuwissen und Goddard, 2000; Olsen et al., 2004).

2.2.4.2 QTL-Feinkartierung

Das eigentliche Ziel einer QTL-Kartierung ist das Auffinden des ursächlichen Gens und der zugrunde liegenden Mutation. Durch die Feinkartierung, auch als *high-resolution-mapping* bezeichnet, wird der Bereich eingeengt, in dem mögliche Kandidatengene liegen und somit auch die Anzahl der positionellen Kandidatengene begrenzt (Andersson, 2001; Kneeland et al., 2004). Das Ziel der Feinkartierung ist es, das Marker-Intervall auf 1 bis 2 cM zu reduzieren (Olsen et al., 2004).

Linkage-Disequilibrium-Kartierung

Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht) bedeutet die nicht-zufällige Assoziation von Allelen gekoppelter Genloci in Abweichung ihrer nach dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium erwarteten Frequenz (Definition nach Kimura, 1956).

Meuwissen und Goddard, 2000 beschrieben erstmals die Linkage-Disequilibrium-Kartierung als Mittel zur Feinkartierung von QTL bei Nutztieren. Bei der Linkage-Disequilibrium-Kartierung werden Markerhaplotypen von eng platzierten Markern (0,25 – 1 cM) genutzt, um das den QTL enthaltende Markerintervall zu ermitteln. Durch eine Regressionsanalyse, die den Effekt des Markers auf das Merkmal schätzt, wird das Kopplungsungleichgewicht zwischen einem einzelnen Marker und dem QTL gemessen (Meuwissen und Goddard, 2000). Dieser Ansatz wird durch Schätzung des Effekts von Markerhaplotypen auf mehrere Markerloci ausgeweitet. Von Markerhaplotypen mit identischen Markerallelen um den QTL wird angenommen, dass sie gleiche Effekte zeigen sofern die Markerhaplotypen identical-by-descent (IBD) sind, und daher dasselbe QTL-Allel tragen (Meuwissen und Goddard, 2000, 2001). Ähnliche Haplotypen beinhalten eine hohe Kovarianz zwischen den Haplotypeneffekten. Es hängt von der Position des QTL ab, ob zwei Markerhaplotypen identische Allele um den QTL haben und demzufolge hängt die Kovarianz zwischen den Haplotypeneffekten von der QTL-Position ab. Daher kann die Kovarianz zwischen Haplotypeneffekten genutzt werden, um die Position des QTL feiner zu ermitteln (Meuwissen und Goddard, 2000, 2001; Meuwissen et al., 2002). Ein weiterer Vorteil der Linkage-Disequilibrium-Kartierung liegt darin, dass historische Rekombinationen genutzt werden, die die Präzision der Schätzung einer QTL-Position erhöht (Farnir et al., 2000; Farnir et al., 2002; Meuwissen und Goddard, 2000). Farnir et al., 2002 beobachteten bei Holstein-Friesian-Rindern, dass sich das intrachromosomale LD über sehr große Teile des Chromosoms („several tens of

centiMorgans“) erstrecken kann und das Ungleichgewicht der Gametenphase bzw. das Kopplungsungleichgewicht häufig zwischen Loci auf verschiedenen Chromosomen (nicht-syntänischen Loci) auftritt. Um Fehler bei der Kartierung mittels LD zu vermeiden, wird von Farnir et al., 2002 deshalb vorgeschlagen Kartierungsdesigns mit kombiniertem Linkage und Linkage-Disequilibrium-Ansatz anzuwenden.

Kombinierte Linkage und Linkage-Disequilibrium-Kartierung (LDL mapping)

Bei Rindern ist die LDL-Kartierung aufgrund der geringen effektiven Populations-, und recht hohen Familiengröße mit einer relativ geringen Markerdichte gut möglich, da in der Rinderpopulation ein beachtliches, genomweites Kopplungsungleichgewicht entstanden ist (Farnir et al., 2000; Meuwissen et al., 2002). Viele Familien mit geringer Familiengröße tragen dabei zu einer höheren Kartierungsgenauigkeit bei als wenige und größere Familien (Lee und van der Werf, 2004). Die kombinierte LDL-Kartierung ist eine robuste Methode für die Feinkartierung komplexer Merkmale. Die Kopplungsinformationen aus den genotypisierten Generationen und das Kopplungsungleichgewicht von „historischen“ Rekombinationen aus nicht genotypisierten Generationen werden dabei kombiniert (Lee und Van der Werf, 2005; Meuwissen et al., 2002). Feinkartierungen mit der LDL-Methode wurden von mehreren Autoren durchgeführt und beschrieben (Farnir et al., 2002; Gautier et al., 2006; Meuwissen et al., 2002; Olsen et al., 2004; Olsen et al., 2005; Schnabel et al., 2005a) und die Effizienz der Methode anhand von Simulationsstudien überprüft (Lee und van der Werf, 2004, 2005, 2006a, 2006b).

2.2.5 Identifizierung von Kandidatengen

Ein Gen, das eine mögliche Rolle bei der Ausprägung eines bestimmten Merkmals oder einer Krankheit spielt, wird als Kandidatengen bezeichnet (Hirschhorn, 2005). Das Ziel der QTL-Feinkartierung liegt in der Eingrenzung der Chromosomenregion auf wenige centiMorgan, in der mögliche positionelle oder funktionelle Kandidatengene liegen (Andersson, 2001; Andersson und Georges, 2004).

2.2.5.1 Positionelle Kandidatengenanalyse

Nach der Kartierung eines QTL oder einer Krankheit auf einen bestimmten Bereich des untersuchten Chromosoms, wird dieses eingehend auf Kandidatengene untersucht, die das untersuchte Merkmal beeinflussen könnten. Anschließend wird das Gen z.B. durch positionelles Klonen oder Sequenzieren auf kausale Mutationen untersucht (Andersson und Georges, 2004). Diese Vorgehensweise wurde unter anderem erfolgreich bei der Feinkartierung der bovinen spinalen Muskelatrophie (SMA) angewendet (Krebs et al., 2006; Medugorac et al., 2003).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das Kandidatengen mit der Identical-by-Descent (IBD)-Kartierung bzw. LDL-Kartierung aufzufinden. Dies gelang bei der Identifizierung der kausalen Mutationen der *Diacylglycerol-Acyltransferase* (DGAT1, BTA14), dem *Osteopontin* (OPN; BTA06) und dem *growth hormone receptor* (GHR, BTA20), die eine Ursache für QTL für Milchleistungsmerkmale beim Rind darstellen (Blott et al., 2003; Grisart et al., 2002; Schnabel et al., 2005a; Winter et al., 2002).

2.2.6 Markergestützte Selektion

Kartierte QTL mit signifikantem Einfluss auf verschiedene Merkmale ermöglichen deren Verwendung in der markergestützten Selektion (marker assisted selection: MAS) als Ergänzung zur konventionellen, auf Phänotypen beruhenden Zuchtwertschätzung und Selektion (Andersson, 2001; Wolf, 2005). Die Anwendung genetischer Marker in der MAS ermöglicht Fortschritte in der Tierzucht durch Genintrogression und die direkte Selektion auf erwünschte Genvarianten in chromosomalen Regionen, die ökonomisch interessante Merkmale beeinflussen (Dekkers und Hospital, 2002; Dekkers, 2004). Laut Dekkers, 2004 und Meuwissen (Meuwissen, FAO, online: <http://www.fao.org/biotech/docs/Meuwissen.pdf>) sind Merkmale, die schwierig durch normale Selektion zu beeinflussen sind (wie z.B. Merkmale mit niedrigen Heritabilitäten, schwer bzw. kostenintensiv messbaren Phänotypen, und Phänotypen, die sich erst in späteren Lebensabschnitten ausprägen) für die markergestützte Selektion von besonderem Interesse. Dekkers beschreibt 2004 außerdem drei verschiedene Markertypen, die zur Etablierung der MAS beitragen: direkte Marker, LD-Marker (Loci, die sich populationsweit im Linkage disequilibrium mit der kausalen Mutation befinden) und LE-Marker (Marker, die sich populationsweit im Linkage equilibrium mit der kausalen Mutation befinden).

Die Anwendung der MAS wird durch mögliche Rekombinationen zwischen Marker und QTL limitiert, vor allem dann, wenn die Tiere nur aufgrund des Markergenotyps selektiert werden und sich Marker und QTL nicht im LD befinden (Van der Werf und Kinghorn, 2000). Van der Werf und Kinghorn, 2000 zeigen ebenfalls, dass die MAS nur begrenzt zum züchterischen Fortschritt beiträgt, wenn das QTL-Allel, auf das selektiert wird, schon in hoher Frequenz in der Population auftritt. Außerdem könnten QTL-Effekte überschätzt werden oder unerwünschte Nebeneffekte bergen. Dekkers, 2004 gibt zu bedenken, dass auf die meisten Merkmale, die in der MAS zur Anwendung kommen sollen, bereits schon in der konventionellen Zucht selektiert wird und daher der züchterische Erfolg durch die MAS nur schwer ersichtlich ist. Außerdem stellt sich gleichzeitig die Frage, ob die kostenaufwändige MAS in diesem Falle noch wirtschaftlich interessant ist (Dekkers und Hospital, 2002).

2.3 Totgeburt und Kalbeverlauf

2.3.1 Die Totgeburt als Merkmal in der Zuchtwertschätzung

Die Zuchtwertschätzung für Kalbeverlauf und Totgeburten in Deutschland wird für die Rasse Fleckvieh gemeinsam mit Österreich 4 Mal jährlich durchgeführt. Totgeburt als Ja-/Nein-Merkmal definiert sich dadurch, ob das Kalb die ersten 48 Stunden post partum überlebt.

Die gemeinsame Zuchtwertschätzung beinhaltet die genetisch eng korrelierten Merkmale Kalbeverlauf und Totgeburtenrate paternal und maternal für die erste und weitere Abkalbungen und ist somit als Achtmerkmalsmodell multivariat (Mehrmerkmalsmodell) (Fürst et al., 2003).

Funktionelle Merkmale wie Totgeburt und Kalbeverlauf weisen recht niedrige Heritabilitäten auf (s. Tabelle 2), was den züchterischen Fortschritt in diesem Gebiet negativ beeinflusst (Fürst et al., 2003; Kühn et al., 2003; Schrooten et al., 2000).

Tabelle 1: Angaben zum Kalbeverhalten bei Fleckvieh-Färsen. Quelle: Leistungsprüfung des LKV Bayern

FV-Färsen	Anzahl Geburten	Totgeburten in %	Geburten mit tierärztlicher Hilfe in %
2002	274.658	7,1	3,5
2003	282.122	7,1	3,5
2004	276.332	6,7	3,1
2005	267.897	6,9	3,2

Tabelle 2: Genetische Parameter (Diagonale: Heritabilitäten, über Diagonale: genet. Korrelation, 1: erste Kalbung, 2: weitere Kalbungen), Daten aus Fürst et al., 2003, nach einer Dissertation von Druet, Universität für Bodenkultur Wien (2002)

	KV1pat	KV1mat	KV2pat	KV2mat	TG1pat	TG1mat	TG2pat	TG2mat
KV1pat	0,09	-0,26	+0,80	-0,35	+0,70	0	+0,63	0
KV1mat		0,04	-0,35	+0,80	0	+0,60	0	+0,54
KV2pat			0,03	-0,52	+0,63	0	+0,70	0
KV2mat				0,02	0	+0,54	0	+0,60
TG1pat					0,02	-0,04	+0,80	-0,06
TG1mat						0,02	-0,06	+0,08
TG2pat							0,01	-0,10
TG2mat								0,01

2.3.2 Genetische Parameter, Interaktionen und Faktoren, die Totgeburt betreffend

Der Grund für eine Totgeburt ist oft schwer ersichtlich. Viele verschiedene Faktoren fließen in das Merkmal Totgeburt ein und oftmals spielen vorangegangene Schweregeburten eine große Rolle.

Messungen bei 24 Stunden alten Angus- bzw. Herefordkreuzungen, beschrieben von Nugent und Notter, 1991, stellten die Körpermaße von Kälbern im Verhältnis zu den erwarteten Abweichungen innerhalb der Nachkommenschaft (expected progeny differences, *EPD*) der Väter für Kalbeverlauf und Geburtsgewicht dar. Erfasst wurden Geschlecht, Gewicht, Kopfumfang, Schulter- und Hüftbreite, Brustumfang, Umfang und Länge des Sprunggelenks sowie die Körperlänge. Es bestanden signifikante Verbindungen zwischen dem *EPD* für Geburtsgewicht und allen Körpermaßen, nach

Korrekturen auf Geburtsgewicht und Trächtigkeitsdauer jedoch nur noch für Kopf- und Sprunggelenksumfang. Kälber von Bullen mit höheren EPDs für Geburtsgewicht hatten den größeren Kopf- und Sprunggelenksumfang. EPDs für Kalbeverlauf waren mit allen Körpermaßen außer der Schulterbreite (mit $P=0,12$ nicht signifikant) negativ korreliert, d.h. im Gegensatz zum EPD für Geburtsgewicht gab die körperliche Form des Kalbes keine Hinweise für eine erhöhte Gefahr von Schweregeburten.

2000 beschrieben Meyer et al. eine statistische Methode (chi-squared automated interaction detector – CHAID), die die signifikanteste Kombination aus sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren herausfinden sollte, die eine Totgeburt zur Folge haben. Es wurden Daten aus sieben US-Staaten des mittleren Westens für die Rasse US-Holsteins herangezogen. Ziel war es, die komplexen Faktoren und Interaktionen wie Geburtenanzahl, Geschlecht des Kalbes (kategorische Daten) und Trächtigkeitsdauer (kontinuierliche Daten), die dem Ja-/Nein-Merkmal Totgeburt zugrunde liegen, darzustellen. Daten wurden von kontinuierlichen in kategorische Messdaten formatiert und gruppiert. Die Ergebnisse wurden als „Trees“ zur besseren visuellen Interpretation dargestellt. Alle Kälber stammten aus künstlicher Besamung. Die Daten für Dystokie wurden der Einfachheit halber in drei Kategorien gruppiert: (1 - kein Problem, 2 - geringfügige Probleme, 3+ - Geburtshilfe nötig). Die durchschnittliche Trächtigkeitsdauer wurde auf $280 \pm 7,5$ Tage angesetzt. Es wurden insgesamt 666.341 Geburten, davon 167.472 Geburten von primiparen und 498.869 von pluriparen Kühen ausgewertet. Die Parität erwies sich mit einem signifikanten Unterschied in der Totgeburtenrate von 11,0% bei primiparen und 5,7% bei pluriparen Kühen als größter Einflusswert, gefolgt vom Dystokiegrad und je nach Grad der Dystokie von der Jahreszeit, dem Geburtsjahr oder der Trächtigkeitsdauer. Bei Primipara war der Dystokiegrad mit 6,1% bei Gruppe 1, 14,3% bei Gruppe 2 und 27,7% bei Gruppe 3+ von größtem Einfluss. In der Gruppe 1 war die Totgeburtenrate im Sommer (6,8%) höher als im Winter (4,7%) und konnte noch weiter nach Geburtsjahr aufgetrennt werden. Bei der Gruppe 2 erwies sich das Geburtsjahr als signifikant für Totgeburt. Der größte Einflusswert in Gruppe 3+ war die Trächtigkeitsdauer, gefolgt von dem Geschlecht des Kalbes, Tiere mit einer Trächtigkeitsdauer von -4 bis +2 Tagen um das Mittel von 280 Tagen hatten mit 25,7% die geringste Totgeburtenrate. Des Weiteren wurde bei männlichen Kälbern und in den Jahren 1994 bis 1996 eine höhere Totgeburtenrate beobachtet.

2001 beschrieben Meyer et al. einen Anstieg der Totgeburtenrate in den Jahren von 1985 bis 1996 in der US-Holstein-Population von 9,5% auf 13,2% bei Färsen und von 5,3% auf 6,6% bei Kühen. Meyer et al., 2001 kamen mit einem „odds ratio“-Ansatz zu einem ähnlichen Ergebnis wie Meyer et al., 2000, nämlich dass die Parität, die Trächtigkeitsdauer, das Geburtsjahr, die Jahreszeit, das Geschlecht des Kalbes und der Dystokiegrad mit dem Merkmal Totgeburt signifikant assoziiert sind. Die Kosten der Totgeburten für die US Milchindustrie belaufen sich seinen Angaben nach auf ungefähr 132 Millionen US-Dollar pro Jahr.

Untersuchungen über genetische Effekte von Totgeburt und Schweregeburt bei Schwedischen Holsteins (Steinbock et al., 2003) zeigten eine ebenfalls unterschiedliche Situation bei Färsen und Kühen. Die erste und zweite Kalbung wurde in zwei Ansätzen separat betrachtet, wobei Varianz- und Kovarianzkomponenten mit einem Einmerkmalsmodell für Vater und Großvater mütterlicherseits geschätzt wurden (lineare Analyse mit REML) und eine Schwellenwertanalyse mit Gibbs sampling zum Einsatz kam. Die Häufigkeit von Schwer- und Totgeburt bei der zweiten Kalbung stieg nicht nennenswert, die Totgeburtenrate bei den Erstgebärenden stieg jedoch von unter 6% auf fast 9% von 1985 bis 1996. Das Alter der Färse zum Zeitpunkt der Geburt in Verbindung mit dem Geschlecht des Kalbes war von großem Einfluss auf den Kalbeverlauf. Bei Bullenkälbern wurde auch hier eine höhere Inzidenz für Tot- und Schweregeburt beobachtet als bei Kuhkälbern. Im Gegensatz zu Meyer et al., 2000 traten vermehrt Probleme im Winter und beginnendem Frühjahr auf, in den Sommermonaten und im Herbst während der Weideperiode sank die Häufigkeit für Schwer- und Totgeburt. Bullen mit 50% oder mehr US-Holstein-Friesian Blutanteil hatten eine höhere Totgeburtenrate als die durchschnittlichen 7,1%. Die Heritabilität wird von Steinbock et al., 2003 für Totgeburt bei der ersten Abkalbung mit 3,8% (paternal) und 2,8% (maternal) angegeben, für Schweregeburt/Kalbeverlauf mit 6,2% (paternal) und 4,8% (maternal). Bei der zweiten Abkalbung waren die Heritabilitäten mit 0,7% (paternal) und 0,3% (maternal) sehr gering. Die genetische Korrelation zwischen Tot- und Schweregeburt belief sich bei Primipara auf 0,8 für den direkten Effekt (paternal) und 0,74 (maternal).

Auswertungen genetischer Parameter für Totgeburt mit einem Bayesschen Modell (Hansen et al., 2004a) ergaben ähnliche Ergebnisse. Die mit einem linearen Modell geschätzten Heritabilitäten lagen bei 5% (paternal) und 6% (maternal). Beim

Vergleich, nach Transformation der Daten, zwischen der Rasse „Original Danish Black and White“ mit 100% Holstein-Friesian lag die Wahrscheinlichkeit für Totgeburt der Holstein-Tiere bei 13,2% im Gegensatz zur Totgeburtenrate von 7,2% bei Danish Black and White-Tieren. Die Korrelation zwischen dem direkten und dem maternalen Effekt lag bei fast Null. Es wurde ebenfalls eine höhere Wahrscheinlichkeit für Totgeburt bei Tieren, die jung abkalben, Kälbern, die im Winter geboren werden und für männliche Tiere beobachtet.

Eine Studie über unerwünschte phänotypische und genetische Trends für Totgeburt bei Dänischen Holsteins (Hansen et al., 2004b) beschreibt einen Anstieg des direkten Effekts für Totgeburt, verbunden mit einem Anstieg des direkten Effekts für Schweregeburt und Größe des Kalbes. Es zeigte sich ein unerwünschter additiv-genetischer Trend bei maternaler und paternaler Totgeburt mit einer hohen genetischen Korrelation zwischen dem direkten Effekt für Tot- und Schweregeburt, sowie Totgeburt und Größe des Kalbes (0,69 bis 0,93 genetische Korrelation). Die Totgeburtenrate stieg von 1985 bis 2002 von 7,1% auf 9%. Wie bereits oben beschrieben vermuten die Autoren als Ursache den massiven Einsatz einiger HF-Besamungsbullen, sowie deren zahlreiche Nachkommen und die damit verbundene Introgression von US-Holstein-Friesian-Genen.

2004 wurden genetische Parameter für Totgeburt und Kalbeverlauf bzw. Schweregeburt für die Fleischrinderrassen Charolais (74.538 Kälber) und Hereford (37.077 Kälber) in Schweden veröffentlicht (Eriksson et al., 2004a). Schweregeburten bei der ersten Abkalbung wurden mit einer Häufigkeit von 6,6% bei der Rasse Charolais und 6,2% bei Herefords angegeben. Bei späteren Abkalbungen belief sich die Rate auf 1,2% (Charolais) bzw. 1,0%. Die Totgeburtenrate war bei Primipara (Charolais 5,9%, Herefords 5,6%) ebenfalls deutlich höher als bei Pluripara (1,8% bei beiden Rassen). Tot- und Schweregeburten traten bei Bullenkälbern 1,4 bis 2,5 Mal häufiger auf als bei Kuhkälbern. Kälber mit hohem Geburtsgewicht wiesen eine klare Tendenz zur Schweregeburt auf. Bei den Totgeburten der Erstgebärenden wurden 42% (Charolais) bzw. 45% (Herefords) der Geburten als Schweregeburt erfasst. Die direkten Heritabilitäten für das Geburtsgewicht (erfasst in kg bis zu vier Tage post partum) werden mit 0,44 bis 0,51, die maternalen Heritabilitäten mit 0,06 bis 0,15 angegeben. Die Heritabilitäten für maternalen Kalbeverlauf bzw. Schweregeburt, welche als binäres Merkmal erfasst wurden (leichte und normale Kalbung 0, Schweregeburt 1), waren für Kühe (0,01 – 0,07) ebenfalls deutlich niedriger als für

Färsen (0,12 – 0,18). Alle Schätzungen der Heritabilitäten für Totgeburt waren mit Werten zwischen 0,0 und 0,02 recht niedrig mit einer Tendenz zu niedrigen Heritabilitäten für die erste Abkalbung. Die genetische Korrelation zwischen direkten und maternalen Effekten war im Allgemeinen negativ oder um Null. Genetische Korrelationen zwischen Geburtsgewicht und Kalbeverlauf stimmen bis auf eine unerwartete negative Korrelation zwischen Geburtsgewicht und maternalem Kalbeverlauf im Großen und Ganzen mit Ergebnissen früherer Studien überein (paternal: 0,62 Charolais und 0,72 Hereford, maternal: 0,46 Charolais und -0,28 Hereford).

Eine Studie zur genetischen Beziehung zwischen Kalbeverlauf und Schlachtkörper für die Fleischrinderrassen Charolais und Hereford zeigte, dass die Körperkondition bzw. der Anteil an Körperfett von jungen Schlachttieren genetisch negativ mit dem Geburtsgewicht korreliert ist, das Gewicht des Schlachtkörpers korreliert positiv mit dem Geburtsgewicht (Eriksson et al., 2004b).

2.3.3 Das Kalb als Ursache der Schwer- und Totgeburt

Die paternale (direkte) Komponente ist ein Maß dafür, wie leicht, bzw. schwer die Geburt der Kälber eines Bullen verläuft (Aumann et al., 1996). Sehr kleine Kälber sind oftmals lebensschwach, überdurchschnittlich große Kälber erhöhen das Risiko einer Schweregeburt und dadurch auch einer Totgeburt. Bullenkälber sind deutlich häufiger von Schwer- und Totgeburten betroffen als Kuhkälber (Eriksson et al., 2004a; Hansen et al., 2004a; Hansen et al., 2004b; Steinbock et al., 2003).

2.3.4 Die Kuh als Ursache der Schwer- und Totgeburt

Die maternale Komponente gibt an, wie leicht, bzw. schwer die Töchter eines bestimmten Bullen abkalben (Aumann et al., 1996). Dies hängt vor allem vom Alter des Tieres (Altschul et al., 1990; Hansen et al., 2004a; Steinbock et al., 2003), von der Anzahl der Geburten, der Trächtigkeitsdauer (Meyer et al., 2000; Steinbock et al., 2003) und Beckenform bzw. Exterieur (Hansen et al., 2004a) des jeweiligen Muttertiers ab. Trotz eines um 7 – 10% geringeren Geburtsgewichtes der Kälber ist der Anteil von Schwer- und Totgeburten bei Färsen wegen ihrer geringeren Körpergröße signifikant höher (Eriksson et al., 2004a). Wehenschwäche,

Uterustorsionen und eine ungenügend geweitete Zervix werden vor allem bei älteren Kühen als wichtige Faktoren angegeben (Eriksson et al., 2004a; Meijering, 1984).

2.3.5 Das „Large Offspring Syndrome“

Das „Large Offspring Syndrome“ (LOS) wurde 1991 erstmals von Willadsen et al. beschrieben und in den kommenden Jahren von verschiedenen Autoren näher untersucht und erläutert.

Manipulationen an bovinen Embryonen wie in-vitro-Fertilisation, Kerntransfer und Embryotransfer haben deutliche phänotypische Konsequenzen wie übermäßiges Wachstum (large calf syndrome), verlängerte Trächtigkeiten und eine erhöhte perinatale Sterblichkeit zur Folge (Moore und Reik, 1996).

Geburten einer großen Anzahl von außergewöhnlich großen Kälbern und Lämmern wurden nach Manipulationen an Embryonen beobachtet (Young et al., 1998). Vor allem Manipulationen, die vor dem Blastozysten-Stadium des Embryos durchgeführt werden, resultieren im so genannten „Large offspring syndrome“ (LOS). Dies wird auf das Einwirken außergewöhnlicher in-vitro- und in-vivo-Faktoren auf die Embryonen zurückgeführt, die zwischen Befruchtung und dem Blastozysten-Stadium auf den Embryo einwirken. Young et al. beschreiben Klonierungen durch Kerntransfer als eine mögliche Ursache.

Gestörtes parentales Imprinting während dieser in-vitro-Techniken wird als Ursache des „Large offspring syndroms“ angegeben. Imprinting ist eine epigenetische Modifikation bestimmter Gene während der Embryonalentwicklung, die eine allel-spezifische Expression eines Gens zur Folge hat, je nachdem welches Elternteil das Gen vererbt. Imprinting resultiert aus der Methylierung von CpG-Inseln auf der genomischen DNA und wird als ein Unterschied zwischen dem epigenetischen Status der beiden Allele verstanden (Moore und Reik, 1996; Moore, 2001).

Bertolini und Anderson, 2002 beobachteten ein deutlich höheres Geburtsgewicht von bis zu 33%, erhebliche Unterschiede in der embryonalen und fetalen Entwicklung, sowie signifikante Unterschiede in der Entwicklung und Ausprägung der Plazenta bei in-vitro befruchteten Tieren.

Andere Untersuchungen an bovinen Embryonen ergaben ebenfalls eine signifikant erhöhte Häufigkeit von Abweichungen in der Embryonalentwicklung, LOS und überdurchschnittliches Geburtsgewicht bei in-vitro produzierten Kälbern (Lazzari et al., 2002). Es wird vermutet, dass die beobachteten durchgehenden Abweichungen

der Expressionsmuster verschiedener, für die Entwicklung wichtiger, Gene eine große Rolle für das Auftreten des LOS spielen.

Cezar et al., 2003 führten ebenfalls eine hohe Anzahl von fetalen und neonatalen Abweichungen in Größe und Wachstum auf Kerntransfer- und in-vitro-Methoden zurück. Feten aus Kerntransfers wiesen deutliche Variationen im Methylierungsgrad des Genoms auf. Kerntransfer-Feten zeigten einen deutlich geringeren Methylierungsgrad des Genoms als in-vitro-Feten und durch künstliche Besamung entstandene Feten.

Auch Hiendleder et al., 2004 beschrieben nach in-vitro-Techniken (in-vitro-Fertilisation und „somatic cell nuclear transfer“-Techniken, SCNT) das „Large offspring syndrome“ mit unverhältnismäßigem Wachstum von Körper und Organen. Auch konnte eine abnorme Ausprägung der Plazenta mit einer erhöhten Anzahl an Plazentomen beobachtet werden. Im Gegensatz zu Cezar et al., 2003 wurde in dieser Studie gezeigt, dass sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Feten aus künstlicher Besamung) bei SCNT- und bis zu einem bestimmten Grad auch bei IVF-Feten eine Hypermethylierung der DNA in fetalem Lebergewebe mit einem unverhältnismäßigen und übermäßigen Wachstum assoziiert ist. Der Methylierungsgrad in plazentärer Koryledon-DNA wies keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Gruppen auf.

Verringerte Trächtigkeitsraten, eine erhöhte Anzahl von Aborten, überdurchschnittlich große Kälber und Deformationen des Bewegungsapparates sowie abnorme Entwicklungen der Plazenta wie z.B. die Hydrallantois werden auch von Farin et al., 2004 bei in-vitro manipulierten Feten angeführt. Das LOS tritt häufiger bei geklonten bovinen Feten als bei in-vitro produzierten Feten auf. Diese Entwicklungen werden auch bei klonierten Schaffeten und neugeborenen Lämmern sowie Mäusen, jedoch nicht bei geklonten Ferkeln beobachtet. Kulturmedien für die in-vitro-Reifung der befruchteten Eizellen scheinen einen Einfluss auf die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren zu haben. Genomisches Imprinting wird unter anderem als eine mögliche Ursache für das LOS angesehen, wobei angenommen wird, dass besondere DNA-Methylierungsmuster die Expression von imprintierten Genen steuern (Cezar et al., 2003; Constanca et al., 1998; Farin et al., 2004; Reik et al., 2001; Young et al., 2003).

2.3.6 QTL-Kartierungen für Tot- und/oder Schweregeburten

Schrooten et al., 2000 führten einen genomweiten Scan zur Erfassung von QTL für körperliche und funktionelle Merkmale in der niederländischen Holstein-Friesian Population durch. Es wurden 18 Exterieur-, 2 Fruchtbarkeits-, 4 Geburts-, 2 Workabilitymerkmale und 1 Eutergesundheitsmerkmal (insgesamt 27 Merkmale) auf 29 Chromosomen mit 277 Markern untersucht. Zur Kartierung mittels Mehrmarker-Regression wurde ein Granddaughter Design von 949 Bullen aus 22 Halbgeschwisterfamilien eingesetzt. Es wurden zwei QTL für maternalen Kalbeverlauf (BTA02 und 03), zwei QTL für Geburtsgewicht (BTA05 und 29) und drei QTL für direkten Kalbeverlauf (BTA05, 06, 21) gefunden. Das Merkmal Totgeburt wurde nicht untersucht.

2003 beschrieben Kühn et al. eine QTL-Kartierung für funktionelle Merkmale in der Deutschen Holstein-Population in einem GDD aus 16 Halbgeschwisterfamilien auf allen 29 Chromosomen und den pseudoautosomalen Regionen der beiden Geschlechtschromosomen mit insgesamt 246 Mikrosatelliten-Markern. Untersucht wurden unter anderem direkte und maternale Totgeburt sowie direkte und maternale Dystokie. Die Kartierung wurde ebenfalls mit einem Mehrmarker-Regressionsmodell und Permutations-Tests durchgeführt. Signifikante QTL mit einer chromosomweiten Irrtumswahrscheinlichkeit von <5% lagen für maternale Dystokie auf BTA08 bei 93 cM, auf BTA10 bei 87 cM, auf BTA18 bei 53 cM sowie für maternale Totgeburt auf BTA08 bei 93 cM, auf BTA10 bei 80 cM und auf BTA18 bei 110 cM. Es wurden des Weiteren mehrere QTL für direkte Dystokie auf BTA07 bei 10 cM, auf BTA10 bei 83 cM und BTA18 bei 107 sowie für direkte, also paternale Totgeburt auf BTA06 bei 58 cM, auf BTA07 bei 9 cM, auf BTA10 bei 79 cM, auf BTA13 bei 32 cM und auf BTA18 auf 75 cM lokalisiert.

Kneeland et al., 2004 entdeckten mit einer identical-by-descent Haplotypenanalyse 13 QTL-Regionen auf sechs Chromosomen (BTA 2, 6, 14, 19, 21 und 23) bei einer kommerziellen Kreuzungslinie in Kanada, welche signifikant mit dem Merkmal Geburtsgewicht assoziiert waren.

Ein Teil der US-Holstein-Friesian Population wurde genomweit für körperliche Merkmale und Kalbeverlauf gescannt (Ashwell et al., 2005). Ein GDD aus 10 Halbgeschwisterfamilien, bestehend aus 1414 Bullen wurde ausgewählt und mit 406 Mikrosatelliten-Markern genotypisiert. Außer Exterieur- und Eutermerkmalen wurde der Kalbeverlauf als prozentualer Anteil an Schweregeburten der Töchter eines

Sohnes ermittelt. Die Kartierung erfolgte mit Hilfe des Programms QTLEXPRESS (Seaton et al., 2002). Mehrere QTL für das Merkmal Kalbeverlauf/Schwergewicht wurden auf den Chromosomen BTA08 (116 cM), 09 (96 cM), 17 (69 cM), 23 (62 cM), 24 (22 cM) und 27 (36 cM) kartiert, die QTL auf BTA08, 17 und 27 erreichten chromosomweit signifikante F-Statistik-Werte von 3,08, 3,19 und 2,97.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

In der Probenbank des Lehrstuhls für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre der LMU München befinden sich Proben von über 3000 Tieren aus Vollblut, Sperma, Haarwurzeln und Geweben, sowie Milchproben von über 48.000 Kühen.

Es steht Probenmaterial verschiedener Rinderrassen zur Verfügung, das als Granddaughter Design (GDD), Daughter Design (DD) oder zur Verknüpfung von Ahnen eines komplexen Pedigrees über sechs Generationen (6GP) gesammelt wurde. Für diese Arbeit wurden nur reine Fleckvieh-Tiere und Fleckvieh-Tiere mit Red-Holstein-Blutanteil untersucht.

3.1.1 Auswahl der Versuchstiere und verwendete Familiendesigns

3.1.1.1 Wichtige Founder-Tiere und deren Nachkommen in der Fleckvieh-Population

Die aktuelle Population im Deutschen Fleckvieh (DFV) besteht aus zwei Gruppen, dem reinen DFV und einer DFV x Red-Holstein-Rückkreuzungspopulation. Diese Rückkreuzungspopulation fand ihren Anfang in den siebziger Jahren, als der Bulle Redad 1973 aus einer Anpaarung einer Schweizer Simmental-Kuh mit dem Red-Holstein Bullen James Red als F1-Generation hervorging. Redad hatte fünf Söhne (Renner, Radi, Repro, Redox und Rex) mit überdurchschnittlichen Zuchtwerten in Milch- und Fleischleistung. In der Zuchtwertschätzung und den Daten der Bullen wird der Red Holstein Blutanteil bis zu einem Minimalanteil von 3% angegeben

Im reinen Fleckvieh-Teil der Population spielen die Bullen Haxl, Horror und Zeus eine übergeordnete Rolle (siehe auch Abbildung 1). Aus Daten des LKV Bayern und der Landesanstalt für Landwirtschaft, Bayern geht hervor, dass nur wenige Bullenmütter keine Redad-, Haxl- oder Horror-Vorfahren in der Abstammung von 5 Generationen hatten. Vor allem der Bulle Haxl, seine Söhne und Enkel wurden stark in der Fleckviehpopulation eingesetzt und sind daher in sehr vielen Pedigrees als Ahnen vertreten.

3.1.1.2 Vorangegangener Scan mit überlappenden Granddaughter Designs

Erste Ergebnisse über einen möglichen QTL mit Effekt auf paternale Totgeburt und paternalen Kalbeverlauf wurden im Rahmen von drei früher durchgeführten Projekten erzielt. Dabei wurden für erste Scans zwei überlappende Granddaughter Designs (1GDDscan und 2GDDscan) mit insgesamt 60 Markern genutzt.

Im ersten GDD (1GDDscan) wurden 5 Chromosomen (BTA04, 06, 14, 20 und 23) für 11 Familien mit 33 Markern untersucht. Im zweiten GDD (2GDDscan) aus 17 GDD-Familien wurden 27 Mikrosatelliten verteilt auf BTA02, 05, 09 und 23 untersucht. Insgesamt befanden sich für 2GDDscan 6 Mikrosatelliten-Marker auf BTA09 (BMS47, ILSTS037, BMS555, BMS1290, BM7209, BMS1943).

Weitere 3 GDD-Familien (GDD 5, 6, 7) wurden in einem anderen Projekt für alle 29 Chromosomen genotypisiert. Insgesamt wurden 29 GDD-Familien aus allen Projekten auf BTA09 untersucht, davon wurden 11 Familien (11GDD) für die Feinkartierung herangezogen.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Familien der sich überlappenden GDDs, die Anzahl an Tieren und den Red-Holstein-Blutanteil der Familienväter. Alle Familien aus 2GDDscan, sowie Familien des 11GDD wurden für Marker auf BTA09 analysiert.

Tabelle 3: Auf BTA09 verwendete GDD-Familien mit Projekt, Vater, Red-Holstein-Blutanteil (%RH) und Anzahl gesammelter Söhne. Die markierten Familien (11GDD) wurden für die Feinkartierung verwendet.

GDD	1GDDscan	2GDDscan	Vater	% RH	Anzahl Söhne
1	x	x	Horror	-	53
2	x	x	Zeus	-	55
3	x		Disko	-	36
4	x		Husar	-	27
5			Horler	-	78
6			Hodscha	-	60
7			Uterino	-	60
8	x		Saxin	-	22
9	x	x	Streitl	-	84
10	x		Rom	-	10
11	x		Balist	-	33
12	x	x	Renner	25	56
13	x		Lotus	-	26
14	x	x	Horwein	-	98
16		x	Report	12	93
17		x	Malf	3	62
18		x	Ralbo	12	96
19		x	Zax	-	80
20		x	Renold	12	79
21		x	Romen	-	62
22		x	Horst	-	64
23		x	Horb	-	54
24		x	Streuf	-	50
25		x	Humberg	-	44
26		x	Radon	12	41
27		x	Propeller	-	39
28			Winzer	6	59
29			Honer	-	28
30			Samurai	-	49
31			Renger	12	61
32			Strovanna	13	57
33			Streib	-	25
36			Poldi	7	113

3.1.1.3 Daughter Design (18DD)

Für die Daughter-Design-Analysen wurden auf BTA09 Milchpools von 18 DD-Familien (s. Tabelle 4) aus den zwei so genannten Ressource-Populationen RP2 (überwiegend deutsches und österreichisches FV) und RP3 (Tiere aus der Rückkreuzung DFV x RH) untersucht. Die Familien wurden mit 6 Mikrosatelliten-Markern als Selektives DNA-Pooling genotypisiert, weitere 2 Marker wurden nach ersten Analysen hinzugenommen (s. Tabelle 5).

Es wurden Pools der Hauptmerkmale Milchmenge (MY) und Proteinprozent (PP) sowie des Nebenmerkmals maternale Totgeburt genotypisiert.

Tabelle 4: Verwendete Daughter Designs für das selektive DNA-Pooling mit 5 Markern. Die grau unterlegten Familien wurden einzeln für ein Set von 15 Markern genotypisiert.

DD-Nr.	Labornummer	Name Vater und Vater	Name Mutter und RH-Blutanteil	Anzahl Töchter
M2A	090033	STEFFEN		2.033
M2B	FV0125	SAMURAI		2.554
M2C	FV0126	SPORT		2.063
M2D	020057	ZITAT		2.275
M2E	020033	ZEUSOR		1.635
M2F	140028	WINZER_6%RH		2.233
M2G	230050	HONER		2.130
M2H	170000	MALF_3%RH		4.043
M2I	FV0145	LANDON		1.755
M2J	FV0140	DONES		2.690
M3A	FV0123	REXON_12%RH		2.012
M3B	120008	REDER_12%RH		2.163
M3C	120009	RENGER_12%RH		2.054
M3D	FV0124	RENNO_12%RH		1.470
M3E	230034	HONNEF_6%RH		1.667
M3F	070016	UTNACH_6%RH		2.051
M3G	FV0005	RAUDI_12%RH		3.329
M3H	FV0009	RUMSI_12%RH		2.327

96 Töchter des Bullen Renger (DD M3C), eines Renner-Sohnes, und 95 Töchter des Bullen Renno (DD M3D), ebenfalls ein Renner-Sohn, wurden einzeln für ein Set von 15 Markern typisiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: In den Daughter Designs verwendete Marker. Die kursiv gedruckten Marker wurden nach der ersten Kartierung auf BTA09 hinzugenommen.

Marker	Position	DD	
		DD (SDP)	Einzeltiere (M3C, M3D)
BMS47	9,653	x	x
<i>ILSTS037</i>	26,266	x	x
BMS555	43,818	x	x
BMS1290	64,935	x	x
BM7209	81,569	x	x
<i>BM4208</i>	90,69	x	x
INRA144	90,98		x
DIK096	94,803		x
BMS2063	95,38		x
URB028	97,285		x
URB024	98,219		x
BM3215	101,647	x	x
LMU0901	103,608		x
BMS1943	103,708	x	x
BMS1967	109,287		x

3.1.1.4 Komplexes 6-Generationen Pedigree (6GP)

Die für diese Arbeit vorgenommenen Untersuchungen in verschiedenen Kartierungsdesigns und die Kombination der Ergebnisse aus diesen machte eine Verknüpfung zwischen den verwendeten Designs (1GDDscan, 2GDDscan, DD18, 11GDD) notwendig.

Um diese notwendigen Verknüpfungen zwischen einzelnen Familien sowie den verschiedenen Kartierungsdesigns herstellen zu können, und um die komplexen Verwandtschaftsbeziehungen der beiden Ressource-Populationen zu berücksichtigen, wurde ein komplexes 6-Generationen-Pedigree zusammengestellt. In diesem 6GP wurden alle verfügbaren Vorfahren der DD- und GDD-Familienväter gesammelt. Um bessere Vernetzungen innerhalb dieses Pedigrees zu erreichen wurden gezielt Proben von Tieren gesammelt, die Familien durch ihre Abstammung verbinden. Dadurch entstand ein 6GP in dem sich 80 männliche, genotypisierte Tiere und 11 genotypisierte Kühe befinden. Die Bullen aus diesem Pedigree setzen sich aus 42 Nachkommen von drei reinen Fleckvieh-Foundern und 35 Nachkommen des

Red-Holstein-Founders James Red zusammen. Die 11 Kühe sind bedeutende Bullenmütter und für eine gute Verknüpfung innerhalb des Pedigrees von Belang (s. Abb. 1).

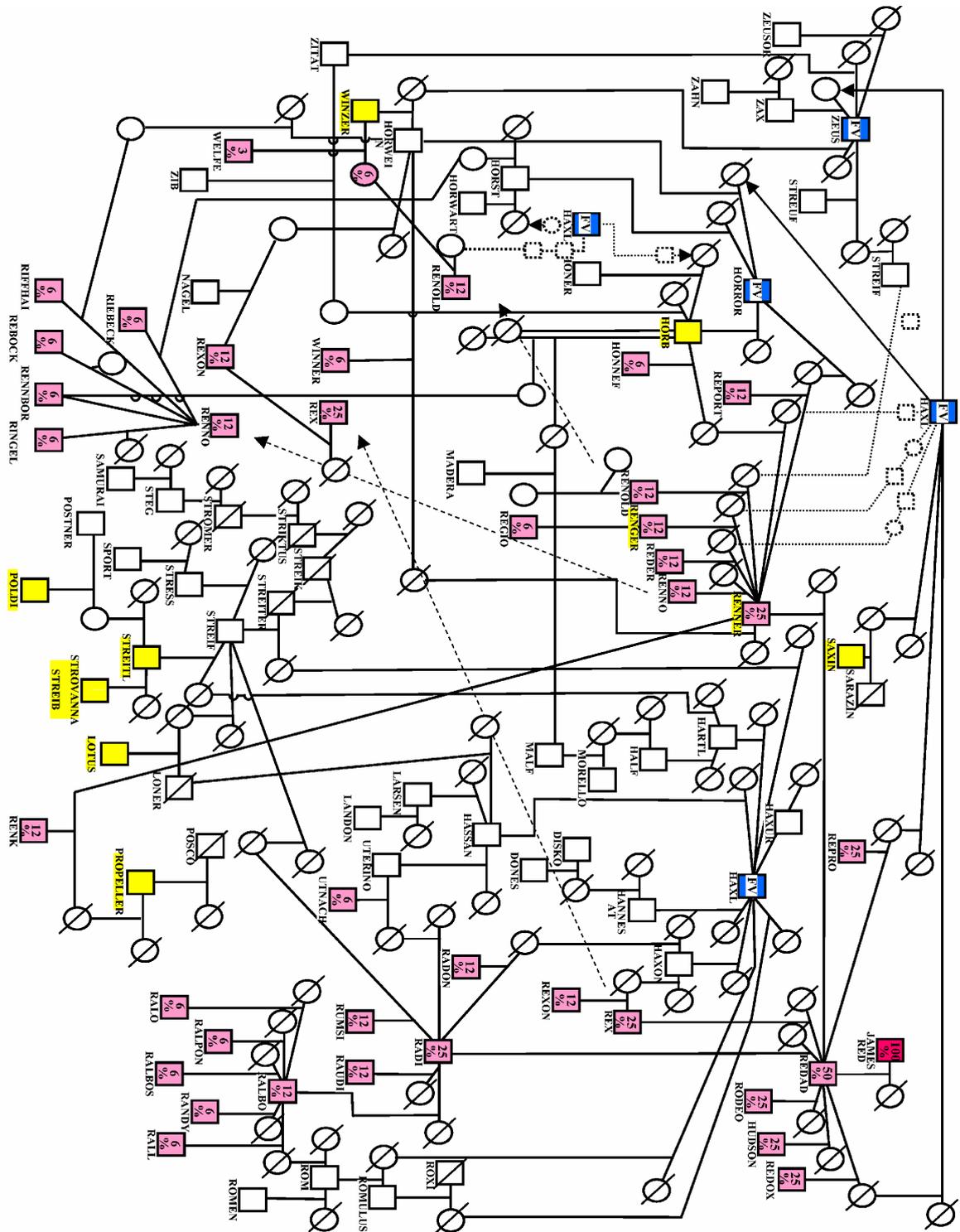


Abbildung 1: Komplexer 6-Generations Pedigree. Männliche Tiere sind als Vierecke, weibliche Tiere als Kreise dargestellt. Nicht genotypisierte Tiere sind durchgestrichen. Tiere mit Red-Holstein-Blutanteil in Prozent sind rot (100% Red-Holstein) und rosa (50% - 6% Red-Holstein) dargestellt, Fleckvieh-Founder blau. Väter der 11 GDD für die Feinkartierung sind gelb unterlegt.

3.1.1.5 Granddaughter Design zur Feinkartierung (11GDD)

Durch Betrachtung der Ergebnisse aus den vorangegangenen Kartierungen mit 1GDDscan, 2GDDscan, der Haplotypisierung und Untersuchungen mit 18DD wurden einzelne GDD-Familien für die Feinkartierung für TGp und KVp ausgewählt.

Es wurden 11 Familien verwendet (s. Tabelle 6): Die Familien Streitl, Renner, Renger und Propeller haben sich im ersten Scan als vielversprechend für die Kartierung von Totgeburt gezeigt, die GDD-Familien Horb, Winzer, Poldi, Lotus, Saxin, Strovanna und Streib wurden aufgrund ihrer Stellung im 6GP bzw. ihrer segregierenden Haplotypen für die Feinkartierung der QTL für paternale Totgeburt und Kalbeverlauf ausgewählt.

Insgesamt wurden in diesen 11 Familien 565 Tiere für 35 Marker auf BTA09 genotypisiert.

Tabelle 6: Für die Feinkartierung auf BTA09 verwendete Granddaughter Designs

Vater	Vatersvater	Familien-ID	Anzahl der Söhne
Saxin	Sarazin	08	22
Streitl	Streif	09	83
Renner	Redad	12	57
Lotus	Loner	13	26
Horb	Horror	23	34
Propeller	Posco	27	29
Winzer	Horwein	28	59
Renger	Renner	31	60
Strovanna	Streitl	32	57
Streib	Streitl	33	25
Poldi	Postner	36	113
11 Familien			565 Tiere

3.1.1.6 Komplexer Pedigree aus 11GDD (CPD)

Durch die für manche Programme notwendige Verbindung aller verwendeten GDD-Familien miteinander entstand ein komplexer Pedigree (CPD) aus 1253 Tieren. In diesem Pedigree befinden sich alle Tiere des 11GDD und deren Mütter, sowie alle Tiere des 6GP zur Verknüpfung der einzelnen Familien.

3.2 Material

3.2.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers

Aceton	Roth
Agarose (Seakem LE)	Biozym
Alconox Powdered Precision Cleaner	Alconox Inc.
APS	GATC
Bindesilan	Amersham
Borsäure ($\geq 99,8\%$, pulv.)	Roth
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTPs)	peqLab
Dextranblau	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
EDTA ($\geq 99\%$ p.a.)	Roth
Ethanol (99%, vergällt)	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Formamid	Sigma
Hot Start DNA Polymerase I (HOT FIREPol)	Solis Biodyne
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalium-dihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Magnesiumchlorid	Solis Biodyne
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
NF Acrylamid (30%)	Roth
NF Harnstoff	Roth
Primer	MWG Biotech
Proteinase K (lyophil., $\geq 30\text{U/mg}$)	Roth
Puffer für Hot Start DNA Polymerase I	Solis Biodyne
Salzsäure (HCl, 37 % p.a.)	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS, $\sim 99\%$)	Sigma
TEMED ($\geq 99\%$)	Invitrogen
Trisbase ($\geq 99,9\%$ p.a.)	Roth
Tween 20	ICN Biomedicals Inc.
Wasser (double processed tissue culture water)	Sigma

3.2.2 Lösungen und Puffer

DNA-Extraktionspuffer

100 mM NaCl
10 mM Tris pH 8,2
2 mM EDTA pH 8,0
1% SDS

TE-Puffer (Tris-EDTA) pH 9

10 mM Tris
1 mM EDTA

PBS-Puffer pH 7,4

0,14 M NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄

Lysispuffer-Proteinase K-Gemisch

50 µl Lysispuffer
6 µl Proteinase K (20 mg/ml in TE)

Lysispuffer K

20 mM Tris-HCl pH 8,3
1,5 mM MgCl₂
25 mM KCl
0,5% Tween 20

Gel-Lösung zur vertikalen Gelelektrophorese (ABI377)

33,6 g NF Harnstoff
8,0 ml TBE-Puffer (10-fach)
10,66 ml NF Acrylamid
ad 80,0 ml Aqua bidest.

TBE-Puffer (10-fach)

162,0 g Tris
27,5 g Borsäure
9,3 g EDTA
ad 1000 ml Aqua bidest.

Formamid-Blaupuffer

10 mg Dextranblau
1,0 ml Formamid

3.2.3 Verbrauchsmaterial

Kimwipes

Kimberly-Clark

Klebefolie für 96-well Platten (Adhesive PCR film)

ABgene

Nescofilm

Roth

Pipettenspitzen 10, 20, 100, 200, 1000 µl,
mit und ohne Aerosolfilter

Biozym

Pipettenspitzen mit abgeflachter Spitze

Applied Biosystems

Reaktionsgefäße 0,75 ml

Biozym

Reaktionsgefäße 1,5 ml

Biozym

Reaktionsplatten, Thermo-Fast 96 wells

ABgene

3.2.4 Geräte

DNA Sequenzierer:	ABI377	Applied Biosystems
	ABI310	Applied Biosystems
Thermocycler:	Primus	MWG Biotech
	Primus96 ^{plus}	MWG Biotech
	PTC-100	MJ Research Inc.
	PTC 200 Gradient Cycler	BioRad
Photometer:	Ultrospec III	Pharmacia LKB
Zentrifugen:	Tischzentrifugen	Bachofer, NeoLab
	Universal 320	Hettich Zentrifugen
	Universal 16 R	Hettich Zentrifugen
	Minishaker MS2	IKA, Bachofer
Waagen:	Sartorius portable PT1200	Sartorius
	Sartorius analytic Pro22F	Sartorius
Pipetten:	Gilson	
	Abimed	
	Eppendorff	
Wasseraufbereitungsanlage:	RiOs	Millipore
	Milli-Q PF Plus	Millipore

3.2.5 Software

Eine Übersicht der verwendeten Lizenz- und Onlinesoftware ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Verwendete Software mit Online-Quelle oder Hersteller

Name	Beschreibung und Quelle
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)
Crimap	Erstellung von Multilocus-Markerkarten (http://compgen.rutgers.edu/multimap/crimap/index.html)
Genescan [®]	Auswertung der Rohdaten der ABI DNA-Seqencer
Genotyper [®]	Bestimmung der Genotypen durch Fragmentlängenmessung (ABI310, ABI377)
LDLrams1.76	QTL-Kartierung mittels Linkage/Linkage Disequilibrium mit random walk approach (ra) und meiosis Gibbs sampling (ms) (zur Verfügung gestellt von S. H. Lee und J. van der Werf, School of Rural Science and Agriculture, Armidale, Australien; Lee und Van der Werf, 2005)
LDL1.42	QTL-Kartierung mit Linkage/Linkage Disequilibrium mit rekonstruierten Haplotypen (zur Verfügung gestellt von S.H. Lee und J. van der Werf, Lee und Van der Werf, 2005)
Primer3	Programm zum Primerdesign (Rozen und Skaletsky, 2000), (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3)
QTLExpress	QTL-Kartierung mittels Intervall-Kartierung (http://latte.cap.ed.ac.uk/)
Simwalk2	Programm zur Analyse von Haplotypen, parametric linkage, non-parametric linkage, identity by descent und mistyping (http://www.genetics.ucla.edu/software/simwalk2)

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Herstellung von Lysaten und Isolation von DNA

3.3.1.1 *Lysatherstellung aus Vollblut*

Mit EDTA versetztes Vollblut wird zum Aufschluss der Zellmembranen mehrere Stunden bei -20°C tiefgefroren. Nach dem Auftauen werden 12 μl in ein Reaktionsgefäß mit 500 μl Lysispuffer K verbracht, geschwenkt und durch Vortexen gut durchmischt. Anschließend werden die Proben 1 Minute bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet 2-3-mal mit der gleichen Menge an Lysispuffer K gewaschen, bis das Pellet frei von Blutfarbstoff erscheint. Der Überstand sollte dann nicht mehr trüb oder durch Hämoglobin rötlich verfärbt sein. Anschließend werden 50 μl Lysispuffer K und 6 μl Proteinase K zugesetzt und bei 65°C 80 min. inkubiert. Zur Deaktivierung der Proteinase K werden nach der Inkubation die Proben für 20 min. auf 94°C erhitzt und danach erneut 1 Minute bei 12.000 x g. zentrifugiert. Die fertigen Lysate können bei -20°C oder im Kühlschrank gelagert werden.

3.3.1.2 *DNA-Präparation aus Vollblut mit kommerziellen Kits*

Da die Lysate aus Vollblut nur eine beschränkte Haltbarkeit haben und die DNA-Konzentration durch die unterschiedliche Anzahl an weißen Blutkörperchen erheblich variieren kann, werden nun die QIAamp DNA Mini Kits der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Das Protokoll des Herstellers wurde wie folgt modifiziert um die Verbrauchsmenge an Blut möglichst gering zu halten:

Zur Lysis der Leukozyten werden 20 μl Protease (Qiagen) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gebracht und mit 30 μl EDTA-Vollblut, 170 μl frischem PBS und 200 μl AL-Puffer (Qiagen) durch Vortexen gemischt. Danach wird das Gemisch mindestens 15 Minuten lang bei 56°C im vorgeheizten Thermomixer inkubiert und anschließend abzentrifugiert. 200 μl 99%iges Ethanol werden zugefügt, gründlich durchmischt und kurz abzentrifugiert. Dieses Gemisch wird auf ein Säulchen in einem neuen 1,5 ml Röhrchen aus dem Kit aufgebracht und 1 min. bei 6.000 x g zentrifugiert - wobei sich die DNA auf das Säulchen bindet - und anschließend in ein

neues sauberes Röhrchen umgesteckt. Danach wird das Säulchen mit 500 µl AW1-Puffer (Qiagen) gewaschen und eine weitere Minute bei 6.000 x g zentrifugiert und wieder in ein neues Röhrchen gesteckt. Nach diesem Schritt wird 500 µl AW2-Puffer (Qiagen) als zweiter Waschpuffer auf das Säulchen aufgetragen und bei 20.000 x g für 3 min. zentrifugiert um Rückstände gründlich zu entfernen und eine möglichst reine DNA zu erhalten. Sodann wird die DNA vom Säulchen eluiert, indem man das Säulchen in ein neues 1,5 ml-Tube steckt und mit 50 µl AE-Puffer (Qiagen) 1 min. bei 6.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wird mit weiteren 10 µl AE-Puffer wiederholt. Das Säulchen wird entfernt und die gebrauchsfertige DNA kann im Kühlschrank bei 4°C oder bei -20°C gelagert werden.

3.3.1.3 Lysatherstellung aus Haarwurzeln

Pro Probe werden 8 – 10 Haarwurzeln in ein 1,5 ml-Tube eingeschnitten, 50 µl Lysispuffer-Proteinase K-Gemisch zugegeben, und 80 min. im 66°C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend dient eine Erhitzung auf 94°C für 20 min. zur Deaktivierung der Proteinase. Das Lysat wird zuletzt 1 min. bei 15.000 x g zentrifugiert und kann dann im Kühlschrank gelagert werden.

3.3.1.4 Selektives DNA-Pooling aus Milchproben

Für das EU-Projekt BovMAS (QLK5-CT-2001-02379) wurde für die QTL-Kartierung von zwei Milchleistungsmerkmalen (projektbezogene Bezeichnung „Hauptmerkmale“: Milchmenge, Proteinprozent) und „Nebenmerkmalen“ wie Proteinmenge, Fettprozent und –menge, Kalbeverlauf, Totgeburt, somatischer Zellgehalt und Non-Returnrate das Selektive DNA (SDP) Pooling nach Darvasi und Soller, 1994 in einem Daughter Design verwendet. Selektives DNA Pooling als eine Kombination aus selektiver Genotypisierung und Poolen von DNA reduziert die Anzahl der zu typisierenden Tiere und ist daher weniger zeitaufwendig und kostenintensiv. Für das SDP ist Milch als DNA-Quelle sehr gut geeignet (Lipkin et al., 1993). Die Anzahl somatischer Zellen, die die DNA des Tieres beinhalten, wird bei der Milchuntersuchung durch den Milchprüfring (MPR) routinemäßig bestimmt. Außerdem kann Milch im Gegensatz zu Blut und Sperma ohne tierärztliche Maßnahmen einfach und kostengünstig gewonnen werden.

Für das SDP werden zwei Töchtergruppen gebildet: Eine Gruppe der besten, für ein Merkmal phänotypisierten Töchter als „high pool“ und eine Gruppe der für das jeweilige Merkmal schlechtesten Töchter („low pool“). Als Selektionskriterium dienen korrigierte Zuchtwerte (Zuchtwert des Tieres minus halben Mutterzuchtwert). Die Milchproben für das SDP stammen aus der routinemäßigen Milchleistungsprüfung durch das Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung (LKV) Bayern. Von jeder Tochter wird für die „Hauptmerkmale“ das Milchvolumen mit 10.000 somatischen Zellen von einem Pipettierroboter (Hamilton Microlab S, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) in den Pool verbracht und in einem unabhängigen Pipettiervorgang als „Duplikat“ wiederholt. „Replikate“ aus derselben Familien-Merkmals-Gruppe werden hergestellt, indem andere Töchter der Gruppe für den Pool ausgewählt werden. Es werden also zwei Replikate pro Gruppe gepoolt, die in unabhängigen Duplikaten wiederholt werden. So entstehen pro Merkmal acht Pools aus durchschnittlich 100 - 108 Tieren, Tiere mit stark erhöhter oder erniedrigter Zellzahl wurden vom Poolvorgang ausgeschlossen.

Für die Nebenmerkmale maternale Totgeburt (TG) und maternaler Kalbeverlauf (KV) wurden nur 5 000 Zellen pro Tier gepoolt. Es konnten, mit Ausnahme einer Familie, aufgrund zu weniger Tiere pro Merkmal keine Replikate gemacht werden, da nicht der Zuchtwert, sondern tatsächlich beobachtete Totgeburten als Selektionskriterium dienen. Für die Kalbeverlauf-Pools wurden die Töchter auf die gleiche Anzahl an Kalbungen standardisiert und normalisierte Phänotypen als Selektionskriterium herangezogen.

3.3.1.5 DNA-Präparation aus Milchpools mit kommerziellen Kits

Für die DNA-Präparation aus Milchpools wurde der QIAamp DNA Blood Midi Kit verwendet. Die Milchpools werden bei 60°C aufgetaut, danach werden die Pools mit gleicher Zellzahl und dadurch resultierenden unterschiedlichen Volumina mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein einheitliches Volumen angeglichen und gründlich gevortext. Anschließend werden die Röhrchen 10 min. in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 20.000 x g zentrifugiert um das MilCHFett zu separieren, welches mit einer gebogenen Pasteurpipette abgenommen wird. Der entfettete Milchpool wird nun gründlich geschüttelt und gevortext, bis das Sediment vollständig resuspendiert ist. 100 µl Protease pro 1 ml Milch-NaCl-Gemisch werden zusammen mit dem Milchgemisch in ein neues 50 ml-Röhrchen gegeben und gevortext. 1,2 ml

AL-Puffer (Qiagen) pro 1 ml Milchgemisch werden zugegeben, gründlich gevortext und mind. 30 min. bei 70°C inkubiert. Danach wird 1 ml 99%iges Ethanol pro ml Milchgemisch hinzugefügt, gründlich gevortext und in mehreren Fraktionen von jeweils ca. 3,5 ml auf die QIAamp-Säulen in neuen 15 ml Röhrchen pipettiert und bei 1.850 x g 3 min. zentrifugiert. Nach Zentrifugation jeder Fraktion wird das Röhrchen geleert. Nun werden 2 ml AW1-Puffer (Qiagen) auf die Säule aufgetragen und bei 4.500 x g 2 min. zentrifugiert. Gleich anschließend erfolgt ein weiterer Wasch-Schritt mit 2 ml AW2-Puffer (Qiagen) und Zentrifugation von 15 min. bei 4.500 x g. Sodann werden die Säulen offen 10 min. bei 70°C 10 min inkubiert, um das Ethanol verdampfen zu lassen. Je nach Anzahl der enthaltenen Zellen pro Pool (Hauptmerkmal bzw. Nebenmerkmal) werden 190 µl oder 380 µl Aqua Bidest. auf die Membran der Säule aufgetragen, 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min. bei 4500 x g zentrifugiert. Das Filtrat wird vorsichtig entnommen und erneut auf die Säule gebracht, 5 min. inkubiert und 5 min. zentrifugiert. Das so gewonnene Filtrat kann nun in 1,5 ml-Tubes gegeben und im Kühlschrank gelagert werden.

3.3.1.6 DNA-Isolation aus Rindersperma

Eine Paillette Sperma wird in ein 2,0 ml-Tube mit 1,5 ml PBS gegeben und 5 min. bei 5.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet insgesamt 2-3 Mal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert, bis der Überstand klar ist. Das Spermapellet muss dabei jedes Mal gut im PBS resuspendiert sein. Anschließend wird der Überstand wieder verworfen und das Pellet mit 0,9 ml DNA-Extraktionspuffer, 100 µl frischer, 0,5 M Dithiothreitol-Lösung und 50 µl Proteinase K (20mg/ml) über Nacht bei 65°C inkubiert. Die Zellwände der Spermien werden hierdurch zerstört und die DNA befindet sich im Überstand. Nach der Inkubation werden 450 µl 6 M NaCl-Lösung dazugegeben, gevortext und 40 min. bei 5.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird dann vorsichtig in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gefüllt, mit 3 ml eiskaltem Ethanol versetzt und vorsichtig geschwenkt, bis die DNA ausfällt und als weißer Faden sichtbar wird. Dieser DNA-Faden wird dann mit einer sauberen Pipettenspitze aus dem Röhrchen gefischt und in ein 1,5 ml Tube mit 100 µl Aqua Bidest. verbracht. Die DNA sollte sich nun mindestens 12 h bei Zimmertemperatur auflösen. Die Konzentration der Stocklösung kann anschließend photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt werden. Als Arbeitslösung wird die DNA

auf 30 ng/ml verdünnt. Stock- und Arbeitslösung können im Kühlschrank gelagert werden.

3.3.2 Auswahl und Suche geeigneter Mikrosatelliten-Marker

3.3.2.1 Suche von Mikrosatelliten in Markerkarten und Primer-Design

Es stehen einige Online-Quellen mit bovinen Mikrosatelliten-Markern zur Verfügung. Für diese Arbeit wurden Mikrosatelliten-Marker aus den in Tabelle 8 aufgelisteten Datenbanken verwendet.

Tabelle 8: Online-Datenbanken mit Mikrosatelliten-Marker-Informationen

Online-Link der Datenbankquelle	Institut oder Forschungsgruppe
http://www.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle.html	United States Department of Agriculture, Meat Animal Research Center
http://www.animalgenome.org/cattle/maps/COMRAD/	NAGRP Cattle Genome Coordination Program
http://www.thearkdb.org/browser?species=cow	entwickelt von der Roslin Bioinformatics Group
http://www.ensembl.org/Bos_taurus/index.html	European Bioinformatics Institute und Sanger Institute
http://www.cgd.csiro.au/cgd.html	Cattle Genome Database, CSIRO Molecular Animal Genetics Centre, (Barendse et al., 1994)
http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bovmap/intro.pl	Institut National de la Recherche Agronomique

Als Auswahlkriterien dienten die Lokalisation des Markers auf dem Chromosom in cM (centiMorgan), der Heterozygotiegrad, die Anzahl informativer Meiosen, die Allelanzahl und –größe sowie die Annealing-Temperatur. Mit dem Programm „Primer3“ (siehe Tabelle 7) können die Primer unter Eingabe der DNA-Sequenz der jeweiligen Datenbank neu platziert werden um die Allelgrößen und Annealing-Temperaturen für die zu erstellende Multiplex-PCR zu optimieren.

3.3.2.2 Suche von Mikrosatelliten aus Genomsequenzen in Internet-Datenbanken und Positionsbestimmung in der Markerkarte

Offt reichen die in Datenbanken vorhandenen Mikrosatelliten für eine Feinkartierung nicht aus. Deshalb wurden vier zusätzliche Marker in den hier interessanten Regionen ausfindig gemacht. Die Mikrosatellitenmarker LMU0902, LMU0904, LMU0905 und LMU0908 wurden durch Suche repetitiver Elemente in relevanten whole-genome-shotgun-Sequenzen und Design passender Primer selbst entwickelt. 3 Markerinformationen stammen aus dem Institut für molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU, Moorversuchsgut (MTZB) (s. Tabelle 9).

Um Mikrosatelliten in whole genome shotgun (wgs)- oder BAC-End-Sequenzen zu finden, wurde eine Textdatei von acht Wiederholungen aller möglichen Di-, Tri- und Tetranukleotid-Repeats erstellt. Mit der Online-Software „BLAST 2 sequences“ (s. Tabelle 7) können die Repeat-Sequenzen der Datei ganz einfach gegen ein bestimmtes wgs- oder BAC-contig im gewünschten Abschnitt des Genoms „geblastet“ werden. Sequenzen, die in beiden zu vergleichenden Eingaben vorkommen, also Mikrosatelliten mit acht oder mehr Repeats, werden als Ergebnis angezeigt. Die BLAST 2-Ergebnisse können dann auf einen geeigneten Mikrosatelliten durchsucht werden. Anschließend wird die Sequenz mit ausreichend vielen, den Repeat flankierenden Basen zum Primerdesign in das Programm „Primer3“ eingefügt.

Die Position der Marker wurde mit der „Build“-Option und der Mehrpunktanalyse des Programms „Crimap“ ermittelt (s. Tabelle 7). Als Eingangsdaten dienen gen- und loc-file mit Genotypen und Markerinformationen. Beide Dateien werden mit einer Datenbankanwendung erstellt.

3.3.2.3 PCR mit einzelnen Mikrosatelliten-Primern

Alle verwendeten Mikrosatelliten-Marker sind am 5'-Ende von Primer 1 (forward) mit den Labels Tet, Fam und Hex fluoreszenzmarkiert.

Die PCR für einzelne Marker werden in 15 µl Reaktionsvolumen angesetzt. Dazu werden 1,5 µl 1-fach Puffer, 1,5 mM MgCl₂ (0,9µl) 100 - 200 µM dNTP (1,5 µl), je 0,5 - 1 µM fluoreszenzmarkierter Forward- und Reverse- Primer, 0,5 U Hot-Start DNA-Polymerase und 15-30 ng DNA-Template verwendet.

Die PCR wird in 96- oder 25-Well-Platten und dazugehöriger Klebefolie zum Schutz vor Verdampfen (ABgene) in Thermocyclern mit Deckelheizung (Primus, Primus 96^{plus} von MWG Biotech, PTC 100 und PTC 200 Gradient Cycler von MJ Research Inc., BioRad) durchgeführt. Das Temperaturprofil des PCR-Programms ergibt sich aus den Bedürfnissen der Taq-Polymerase sowie Annealing-Temperaturen der verschiedenen Marker und setzt sich wie folgt zusammen:

15 Min.	94°C	Aktivierung der Taq-Polymerase
35 bis 42 Zyklen:		
1 Min.	95°C	Denaturierung der DNA
1 Min.	58 - 61°C	Annealing, markerspezifisch
1,5 Min.	72°C	Extension
7 Min.	72°C	Vervollständigung der Amplifikation
45 Min.	60°C	Anhängen eines Adenosins
Kühlung auf 4°C		

Das PCR-Produkt kann bei 4°C im Kühlschrank oder -20°C im Tiefkühlfach bis zur Verwendung gelagert werden

3.3.2.4 Zusammenstellung der Marker in Multiplex-PCRs

Zur effizienteren Amplifikation von Mikrosatelliten-Markern werden oft Multiplex-PCRs zusammengestellt, die pro PCR-Ansatz mehrere Marker enthalten.

Für diese Arbeit wurden vier Multiplex-PCR mit insgesamt 35 Markern zusammengestellt und optimiert (s. Tabelle 9 und 10):

- Multiplex „gws“, bestehend aus 5 Markern für erste Scans in 2GDDscan und 18DD
- Multiplex „sb“ mit 10 Markern für weiterführende Analysen in 11GDD, 18DD und 6GP
- Multiplex „fm09sb“ mit 18 Markern für die Feinkartierung der 11GDD und zur Genotypisierung des 6GP
- Multiplex „fm29_09“ für die Analyse von BTA29 mit 2 zusätzlichen Markern auf BTA09

Je nach maximaler Allelgröße und Möglichkeit zur Detektion verschiedener Farben sind Multiplex-PCRs von mehr als 20 Markern möglich. Voraussetzungen für die Kombination verschiedener Marker sind unterschiedliche Fragmentgrößen pro Farbe und eine einheitliche Annealing-Temperatur. Fragmentgrößen und Annealing-Temperatur wurden mit „Primer3“ ermittelt. Zwischen den bekannten Allelgrößen wurden Abstände von mindestens 10 bis 15 Basenpaaren belassen, um Überschneidungen einzelner Fragmente in der Elektrophorese zu vermeiden. Mit der „nucleotide-nucleotide BLAST“-Funktion wurde überprüft, ob sich die einzelnen Primer an anderen Stellen des Genoms oder andere Primer anlagern könnten, um Artefakte und Primer-Dimere zu vermeiden. Falls es zu einer Kompatibilität der Primersequenz mit anderen Sequenzen im Genom kam, so sollte der Primer nicht farbmarkiert sein oder wurde mit „Primer3“ verschoben um fluoreszierende Nebenprodukte und störende Peaks zu vermeiden.

Nach Kontrolle der Größe, des Heterozygotiegrads und der Ausprägung der Marker in der Elektrophorese wurden gute Marker in der jeweiligen optimalen Konzentration mit einer optimierten Annealing-Temperatur, Puffer- und $MgCl_2$ -Konzentration zusammengestellt. Von den 35 Markern flossen 33 Markern in die Analysen ein.

Tabelle 9: Auf Chromosom 9 typisierte und analysierte Mikrosatellitenmarker, Name der Multiplex, Position und Datenbankinformationen.

	Marker	Multiplex	Position (cM)	Datenbank	Accession No. / Contig	Bemerkung
1	BMS47	sb/gws	9,653	GENBANK	G18829	
2	DIK2433	fm09sb	15,121	DDBJ	AB164983	
3	DIK2876	fm09sb	20,415	DDBJ	AB165271	
4	BM1227	fm09sb	24,139	GENBANK	G18418	
5	ILSTS037	sb/gws	26,266	GENBANK	L37215	
6	BM2504	fm09sb	30,920	GENBANK	G18777	
7	DIK3003	fm09sb	36,542	DDBJ	AB166399	
8	BMS1267	fm09sb	38,742	GENBANK	G18647	
9	BMS555	sb/gws	43,818	GENBANK	G18572	
10	BM4627	fm09sb	47,115	GENBANK	G18805	
11	UWCA09	fm09sb	49,996	GENBANK	L15338	
12	BMS1290	sb	64,935	GENBANK	G18649	
13	BM7209	sb/gws	81,569	GENBANK	G18791	
14	BM4208	sb	90,690	GENBANK	G18509	
15	INRA144	sb	90,980	keine Angabe		
16	DIK096	sb	94,803	GENBANK	D83315	
17	BMS2063	sb	95,380	GENBANK	G18717	
19	URB028	sb	97,285	GENBANK	U21764	
18	URB024	sb	98,219	GENBANK	U21763	
20	BMS2295	fm09sb	98,646	GENBANK	G18938	
21	LMU0902	fm09sb	99,000	wgs contig	AAFC02003161	eigener Marker
22	BM3215	sb	101,647	GENBANK	G18802	
23	DIK4548	fm09sb	101,700	DDBJ	AB165751	
24	DIK4140	fm09sb	103,046	DDBJ	AB165459	
25	LMU0904	fm09sb	103,100	wgs contig	AAFC02016234	eigener Marker
26	LMU0905	fm09sb	103,400	wgs contig	AAFC02116104	eigener Marker
27	LMU0907	fm09sb	103,520	wgs contig	AAFC02048204	MTZB
28	LMU0906	fm09sb	103,670	wgs contig	AAFC02060668	MTZB
29	LMU0901	sb	103,700	wgs contig	AAFC02158291	MTZB
30	BMS1943	sb/gws	104,208	GENBANK	G19021	
31	LMU0908	fm09sb	104,500	wgs contig	AAFC02084580	eigener Marker
32	DIK2045	fm29_09	106,960	DDBJ	AB164793	
33	BMS1967	sb	109,287	GENBANK	G18713	

Tabelle 10: Primersequenzen der genotypisierten und analysierten Mikrosatellitenmarker auf BTA09. Primer 1 (forward) ist am 5'-Ende fluoreszenzmarkiert („label“). Die grau unterlegten Primer wurden mit „Primer3“ modifiziert um die Fragmentlänge zu verändern.

Marker	Primer 1 (forward, 5' – 3')	Primer 2 (reverse, 5' – 3')	Label
1 BMS47	CAGAGAGCGTCTGTGGAGG	TCTTGTCTGGCTGGATGATG	fam
2 DIK2433	TGTGGGGCTCCTTTGTAAC	CAGAGCGGCTACAGTTTGTG	fam
3 DIK2876	TTGCTGTTGAATTTTCATGGAT	ATAGTCCCACCGCGAAACTC	fam
4 BM1227	CACCAGTGATATTGGCTTATGG	GGAAGAAACACTTCCAAACCC	fam
5 ILSTS037	TAGGCTATGTAAGTACCATGC	CTGAACTGAGATGACTTTGGC	hex
6 BM2504	CAGCTTTCCATCCCCTTTC	CTCCCATCCCAAACACAGAC	tet
7 DIK3003	ACTTTCAGTTTTGGGCTGAC	TGTCACTAGGTAAATTGGTG	fam
8 BMS1267	CCCAGAGTAAACTGTTGGTGA	TGTTGTCCTGGAAGGCTTTAG	hex
9 BMS555	GGAAAGAGTAGGTGATTCCCTG	ATTTAATTGTCATCCCAGGTGA	tet
10 BM4627	AGGACAAGCTGGCTTCTGAG	TGAAGCAACTGGGTATGCAC	hex
11 UWCA09	CCTTCTCTGAATTTTTGTTGAAAGC	GGACAGAAGTGAGTGACTGAGA	hex
12 BMS1290	TTGGCACTTACTACCTCATATGTT	TTTTCTGGATGTTGAGCCTATT	tet
13 BM7209	TTTTCTGCTCATGCTTCAGTG	GCAGGCTATAGTCCATGACATC	tet
14 BM4208	TCAGTACACTGGCCACCATG	CACTGCATGCTTTTCCAAAC	fam
15 INRA144	TCGGTGTGGGAGGTGACTACAT	TGCTGGTGGGCTCCGTCACC	tet
16 DIK096	GCTGTAATGAGGCACCACAAT	GCTTGCAGACTCCCTCTCTC	fam
17 BMS2063	GGGGAGGAGCTTAAGTAGGAA	TGAATGAGTACGTGTGTGCA	fam
18 URB028	GATTCAGTCTCTCAACAACCTT	CATGTCAGGCATCAGTCCATAG	tet
19 URB024	ATCGGACACCACCTAGCAAC	CATGTGAGCATATTCTGAAGCA	tet
20 BMS2295	GCTCTGGTGACCCAGGTG	CTGGCAGGAGATGAGAGGAG	hex
21 LMU0902	GGGAAAAGAAACCCAGACA	GCCTGAAAACCTTGATACTGAGC	tet
22 BM3215	TGCATCAACTAAGCCACACTG	TGAGCATTGCCTGAAGAGTG	fam
23 DIK4548	TGATGAGGGCCTCTGAGAAT	CTAGACGCCGAATTCTGACC	fam
24 DIK4140	CACGACTGGTGAGACTGGTG	ACCTGCCTGCAACGTTAAAT	fam
25 LMU0904	AAGCATGGTGGCTTAGTGGT	AAAATGACAAAGGTAGGGCAAA	hex
26 LMU0905	CCAGGGAAGTCCAGTGAATG	TCTAGAGCAGGCAGGACACC	hex
27 LMU0907	CCCCTCTTGGGCATACATT	CCATGTTTTTACAGATGGCATT	tet
28 LMU0906	TCTCCTGCAAGAACGTGAGA	AGACTGTGGGCAGCTTGCT	tet
29 LMU0901	CCAGCTGGTGAAGTCAAACA	TGACATCTCGACTCCCATTCT	fam
30 BMS1943	ATCAGTCGTTCCAGAATGTC	TTGATATCCTCTCTGTCAAGCC	hex
31 LMU0908	GGTCACATGCACACATCCTC	ATGCTTGCTTCCAAACATCC	hex
32 DIK2045	CTTCCACTCAGCAGCCTTT	GGCTCCAGTATTCTTTCTTGGGA	fam
33 BMS1967	GGGCAGATGTGAGTAATTTTCC	AACTGAGCTGTATGGTGGACG	hex

3.3.3 Gelelektrophoretische Typisierung fluoreszenzmarkierter Mikrosatelliten

3.3.3.1 Agarosegel

Zur schnellen Qualitätskontrolle einer PCR bzw. zur Kontrolle der ungefähren Fragmentlängen wurde das PCR-Produkt auf ein Agarosegel mit externer DNA-Leiter als Standard aufgetragen. Je nach Größe des PCR-Produkts wird eine Konzentration des Gels von 0,5 – 2,5% gewählt. Sichtbar werden die Fragmente durch Zugabe von 11,5 µl Ethidiumbromid, das sich an die DNA bindet und unter UV-Licht fluoresziert.

3.3.3.2 ABI310

Für die Genotypisierung der PCR-Produkte aus Proben des SDP wird der Kapillarsequenzierer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer von PE Applied Biosystems verwendet. Mit diesem Gerät können die Genotypen mit sehr vielen Peaks sehr genau und präzise detektiert und genotypisiert werden. Die Länge der Fragmente wird über einen internen, Tamra markierten Standard mit definierten Fragmentlängen bestimmt. Die Proben werden nach Anleitung des Herstellers zur Elektrophorese vorbereitet und verdünnt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mit der Software ABI PRISM GeneScan[®], die Bestimmung der Allele mit Fragmentlänge in Basenpaaren, Peakhöhe und Peakfläche mit der Software ABI PRISM GenoTyper[®].

3.3.3.3 ABI377

Der ABI PRISM 377 Genetic Analyzer des gleichen Herstellers wurde zur schnellen und effizienten Genotypisierung der PCR-Produkte von Multiplex- und Einzel-PCRs verwendet. Die Elektrophorese erfolgt durch ein 4%iges Polyacrylamidgel zwischen zwei Glasplatten.

Zur Fragmentlängenbestimmung dient ebenfalls der externe Tamra-Standard. Die Proben werden ebenfalls wie im User-Manual des Gerätes vorbereitet und für die jeweilige Multiplex-PCR oder Fluoreszenz des Primers optimal verdünnt. Die Rohdaten werden mit dem Programm GeneScan[®] aufgearbeitet und die Fragmentlängen mit GenoTyper[®] bestimmt.

3.4 Biometrische und statistische Methoden

3.4.1 Zuchtwerte und Phänotypen

3.4.1.1 Berechnung der Zuchtwerte für Totgeburt

Für die QTL-Kartierungen wurden Zuchtwerte der Zuchtwertschätzung vom August 2006 verwendet (Achtmerkmalsmodell).

Für unsere Analysen stellte sich heraus, dass ein Ausschalten der bekannten genetischen Korrelationen zwischen paternalen und maternalen Effekten der Schwer- und Totgeburtspheänotypen bessere Kartierungsergebnisse liefert. Daher wurde für uns eine spezielle Einmerkmalsmodell-Zuchtwertschätzung (SBp, SBp1, SBp2, SBm, SBm1, SBm2, CEp, CEp1, CEp2, CEm, CEm1, CEm2. Kalbungen gesamt, 1. und 2. Abkalbung) unter Berücksichtigung der gesamten Deutsch-Österreichischen Fleckviehpopulation von der ZuchtData GmbH Wien durchgeführt. Für die Einmerkmalsmodell-Zuchtwertschätzung wurden ebenfalls die Zuchtwerte vom August 2006 herangezogen.

3.4.1.2 Berechnung der Zuchtwerte für Milchleistungsmerkmale

Für Milchleistungsmerkmale wurden die jeweils aktuellen Zuchtwerte (bis August 2006) verwendet. Die Zuchtwerte für Fett- und Eiweißprozent werden indirekt aus den Zuchtwerten für Milch-, Fett- und Eiweißmenge berechnet.

Für die Analysen werden korrigierte Zuchtwerte (ZWk) und „Daughter Yield Deviations“ (DYD) verwendet. Korrigierte Zuchtwerte werden wie folgt berechnet:

$$\text{ZWk} = \text{ZW Tier} - \frac{1}{2} \text{ Mutter-ZW}$$

Als Daughter Yield Deviations werden die um Umwelteinflüsse und um den Mutter-Zuchtwert korrigierten Leistungsabweichungen der Töchter bezeichnet (Emmerling und ZuchtData GmbH, 2005). Diese wurden für uns vom Institut für Tierzucht der Landesanstalt für Landwirtschaft, Bayern in Grub zur Verfügung gestellt.

3.4.2 Programme zur Interpretation und Auswertung der Daten

3.4.2.1 Haplotypenanalyse

Die Haplotypenanalyse als Mehrpunktanalyse wird mit SimWalk2 vorgenommen. Dieses Programm schätzt den wahrscheinlichsten Haplotyp, der von Mutter oder Vater segregiert, für jedes Individuum im Pedigree. Rekombinationen innerhalb eines Haplotyps werden angezeigt und Daten für die Wahrscheinlichkeit dieser Rekombination können auf mögliche Genotypisierungsfehler hinweisen.

Als Input-Daten dienen ein loc-file mit den Allelfrequenzen aller Marker, ein ped-file mit Abstammungen, Geschlecht und den Genotypen aller verwendeter Tiere und Eltern und ein map-file der Marker mit Position in Morgan. Die Input-Daten werden mit einer Datenbankanwendung in der erforderlichen Form erstellt.

Die Haplotypenanalyse wurde für 6GP aus 91 genotypisierten Tieren mit 15 Markern erstellt. Dafür wurden sämtliche Ahnen (männlich und weiblich) in die Analyse miteinbezogen und mehrfach verknüpft um die Haplotypen gut ableiten zu können. Damit wurde die Analyse mit insgesamt 188 Tieren durchgeführt.

Haplotypenanalyse für die LDL-Kartierung

Um Haplotypen für das GDD von 565 Tieren aus 11GDD (s. Tabelle 6) innerhalb eines komplexen Pedigrees (CPD) für die Feinkartierung mit dem Programm LDL1.42 zu erhalten, wurden diese 565 Tiere und 33 Marker (s. Tabelle 9) mit ihren verfügbaren Ahnen in mehrere Gruppen aufgeteilt. Insgesamt beläuft sich die Anzahl der Tiere aus 11GDD und ihrer wichtigsten Vorfahren innerhalb dieses komplexen Pedigrees auf 1253 Tiere. Da es aufgrund begrenzter Rechenleistung und zu hohem Zeitaufwand nicht möglich wäre, alle Tiere zusammen zu haplotypisieren, wurden die Tiere familienweise mit ihren Ahnen und den am besten genotypisierten Individuen (für alle 33 Marker genotypisierte Tiere, je nach Familie zwischen 13 und 20 Tiere) einer verwandten Familie gruppiert, um die Haplotypen optimal ableiten zu können. Die maximale Anzahl der Tiere als Input-Datei (ped-file) lag bei 467 Individuen (264 - 467 Tiere pro überlappendes Subpedigree, durchschnittlich 358 Tiere), was mit 33 Markern mehr als 9 Tage in Anspruch nahm (Intel Xeon Prozessor 3,6 GHz, 4069 MB 400 MHz DDR2-SDRAM).

3.4.2.2 Test auf Kopplung zwischen Marker und QTL beim selektiven DNA-Pooling und Approximative Interval Mapping

Individual sire-by-marker combination: Wie bei Lipkin et al., 1998 und Mosig et al., 2001 beschrieben, wurde der P -Wert für die Kombination eines bestimmten Bullen (i) bei einem bestimmten Marker (j) als die zweifache Fläche einer Normalverteilung (two-tail test) von $Z(D_{ij}) \rightarrow +\infty$ wo $Z(D_{ij}) = (D_{ij})/SE(D_{ij})$ erhalten. D_{ij} ist die Differenz der Allelfrequenzen zwischen dem high- und low-Pool der Töchter des Bullen i bezogen auf den Marker j , $SE(D_{ij})$ ist der *standard error* von D_{ij} . D_{ij} wird durch die Differenz der Frequenzen der Mittel von zwei Replikaten des high- und low-Pools berechnet und ein Test zur Markersignifikanz über gepoolte Z_{ij} -Werte für diese D_{ij} durchgeführt.

Single marker across sires: Die Signifikanz eines Markers m_{ij} eines bestimmten Bullen j , der an diesem Marker heterozygot ist, wird durch Z_{ij} beschrieben.

Die beobachtete Teststatistik ist $T_{ij} = Z_{ij}^2$, unter der Nullhypothese „keine Kopplung“ ergibt sich daraus $T_{ij} \sim \chi^2$.

Die Signifikanz eines Marker m_i über eine Anzahl von j Bullen wurde berechnet wie folgt:

$$TS = \sum_{j=1}^{S_j} T_{ij} \sim \chi^2_{(s_j)}$$

s_j ist die Anzahl heterozygoter Bullen, die für den Marker j getestet wurden. P_j wird durch die zweifache Fläche der chi-Quadrat Verteilung ermittelt ($\chi^2_j \rightarrow +\infty$).

Ein experimentweiter Kopplungstest mit Hilfe einer „**adjusted false discovery rate**“ (aFDR) wurde wie bei Mosig et al., 2001 durchgeführt und „allele substitution effects“ wurden wie von Lipkin et al., 1998 berechnet.

Das „Approximative Interval Mapping“ (AIM) für sel. DNA-Pooling

Eine Kombination aus „Individual sire-by-marker-Test“, „Single marker across sire-Test“ und der „adjusted false discovery rate“ wird im „Approximative Interval Mapping“ verwendet.

Das AIM beobachtet die Teststatistik genotypisierter Bullen über mehrere Marker auf einem Chromosom. Die Teststatistik wird durch die Anzahl an Tieren und den QTL-Status bestimmter Tiere, die heterozygot an einem bestimmten Marker sind, mehr oder weniger stark beeinflusst.

Das AIM für selektives DNA-Pooling wurde von der Universität für Bodenkultur (BOKU), Wien in Zusammenarbeit mit der University of Edinburgh entwickelt (Dolezal et al., 2005). Die Auswertung der Daten erfolgte daher an der BOKU Wien.

3.4.2.3 Intervallkartierung in den Granddaughter Designs

Um einzelne oder multiple QTL in einfachen und komplexen Pedigrees mit Hilfe einer Intervallkartierung zu bestimmen wurde das Programm QTLexpress ausgewählt. Als Phänotyp wurde ein Regressionsmodell für das Halbgeschwister-Design mit korrigierten Zuchtwerten verwendet. Mit QTLexpress wurden Bootstrap- und Permutations-Tests zur Bestimmung von Vertrauensintervall und *P*-Werten durchgeführt. Für sämtliche Auswertungen wurden die Berechnungen pro 1 cM und mit 10.000 Permutationen vorgenommen.

Input-Dateien sind eine Genotypen- (gen), Marker- (map), und Phänotypen-Datei. Alle drei Dateien werden von einer Datenbankanwendung in der vorgeschriebenen Form erstellt.

Erste Analysen mit QTLexpress wurden mit 26 GDD-Familien (2GDDscan und 8 Familien aus 11GDD, 1531 Tiere) und insgesamt 19 Markern durchgeführt. Nicht jede Familie wurde für dieselben Marker typisiert. Für 11GDD belief sich die Anzahl der zu analysierenden Tiere auf 568 Tiere, welche mit 33 Markern für Zuchtwerte aus dem Ein- und Achtmerkmalsmodell analysiert wurden.

QTLexpress als Intervallkartierungsprogramm mit linearer Regression ist in der Lage, mehrere Familien, die für unterschiedliche Markersets genotypisiert sind, in einer familienübergreifende Analyse zu kombinieren.

3.4.2.4 Kombinierte Linkage Disequilibrium und Linkage Analyse mit „random walk approach“ und „meiosis Gibbs sampling“

Für die Feinkartierung von 11GDD, eingebettet in einem komplexen Pedigree (CPD), wurde die Linkage und Linkage Disequilibrium-Kartierung (LDL-Kartierung) mit LDLrams1.76 von S. H. Lee und J. van der Werf verwendet (s. Tabelle 7).

Die Position des QTL kann mit diesem Ansatz relativ präzise bis auf weniger als 1 cM kartiert werden. Für die LDL-Kartierung und die Schätzung der IBD-Wahrscheinlichkeiten sind beobachtete Markerdaten und Pedigree-Informationen nötig.

Zur Analyse mit LDLrams1.76 werden ein ped- (Genotypen und Abstammungsinformationen), dat- (Phänotypen) und map- (Markerdistanzen und Informationen für den Programmablauf) File benötigt, welche ebenfalls mit einer Datenbankanwendung vorbereitet werden. Im map-file wurden „mutation age“ und die effektive Populationsgröße auf 100 festgesetzt, der Homozygotiegrad der Marker betrug 0,25. Die hier gemachten Analysen wurden mit 1235 Tieren, 33 Markern und 5500 Samplings bei 500 Burning Periods durchgeführt.

Die von LDLrams1.76 durch den „random walk approach“ und „meiosis Gibbs sampling“ berechnete genotype relationship matrix (GRM-Datei) kann als Eingangsdatensatz für das Programm LDL1.42 verwendet werden. Somit muss diese nicht für Analysen mit anderen Phänotypen aber gleichen Genotypen zeitaufwendig berechnet werden.

3.4.2.5 Kombinierte Linkage Disequilibrium und Linkage Analyse

Da aufgrund des Datenmaterials aus Ein- und Mehrmerkmalsmodell-Zuchtwerten und drei zu untersuchenden Merkmalen eine große Anzahl an Analysen notwendig war, wurde das Programm LDL1.42 von S. H. Lee und J. van der Werf verwendet (s. Tabelle 7). Bei diesem Programm ist es möglich, unabhängig berechnete Haplotypen (z.B. aus SimWalk2) oder GRM-Dateien aus LDLrams1.76 zu verwenden. Dies bringt eine erhebliche Zeitersparnis, da nicht bei gleichen Genotypen für jedes zu untersuchende Merkmal Haplotypen berechnet oder geschätzt werden müssen.

Als Ausgangsdateien dienen ein ped-file (Haplotypen oder Genotypen), dat- und map-files (Struktur des map-files wie bei LDLrams1.76).

Als ped-file wurden Haplotypen aus „SimWalk2“ verwendet und die Haplotypen aus verschiedenen SimWalk2-Subpedigrees (s. Kapitel 3.4.2.1) mit Datenbank-anwendungen summiert, modifiziert und kontrolliert. Bei unterschiedlich haplotypisierten Tieren wurde der Haplotyp vom, für das jeweilige Tier, am besten haplotypisierten Subpedigree ausgewählt. Dazu wurden die verschiedenen Haplotypen einzelner Tiere verglichen und nur Haplotypen verwendet, die in mehreren Subpedigrees gleich und mit den Haplotypen ihrer Vorfahren und Nachkommen im Einklang waren.

Für die Kartierung mit LDL1.42 kamen 1253 Tiere des CPD mit 33 Markern zum Einsatz. Mutation Age und die effektive Populationsgröße war 100, der Homozygotiegrad der Marker 0,25, es wurde kein Bending verwendet.

4 Ergebnisse

Im Rahmen drei vorangegangener QTL-Kartierungsprojekte wurden mehrere Fleckviehfamilien für verschiedene Chromosomen analysiert. Zuerst wurden die früher erzielten Genotypisierungsergebnisse zusammengeführt und reanalysiert.

Anhand dieser Analysen konnte bei 18 Familien ein indikativer QTL für paternale Totgeburt bzw. paternalen Kalbeverlauf auf Chromosom 9 beobachtet werden. Ziel dieser Arbeit war es nun zu klären, inwieweit dieser QTL in der Fleckviehpopulation segregiert, die Position des QTL näher zu bestimmen und mögliche Kandidatengene zu evaluieren.

Hier sollen die zugrunde liegenden Kartierungsergebnisse, welche aus erneuten Analysen der Daten aus den vorangegangenen Projekten stammen, dargestellt werden. Die Synthese der Kartierungsergebnisse und die nachfolgende Auswahl der Familien und Marker für die Feinkartierung anhand der Haplotypenanalyse wird anschließend präsentiert. Dann werden die Ergebnisse der Feinkartierung mit verschiedenen Modellen und Kartierungsdesigns beschrieben. Zuletzt werden mögliche Kandidatengene ermittelt.

Die Kandidatengenanalyse auf BTA09 wies auf ein mögliches Kandidatengen auf BTA29 hin, welches auf die hier untersuchten Phänotypen Kalbeverlauf und Totgeburt einen Einfluss haben könnte. Somit wurden 10 Familien aus 11GDD für 13 Marker auf BTA29 analysiert. Diese Kartierungsergebnisse werden ebenfalls dargestellt.

4.1 BTA09

4.1.1 QTL-Kartierung für paternale Totgeburt und paternalen Kalbeverlauf

4.1.1.1 Erster Scan für paternale Totgeburt und paternalen Kalbeverlauf

Im ersten Scan und bei der Reanalyse mit Zuchtwerten vom August 2006 wurde in 2GDDscan ein indikativer QTL für paternale Totgeburt (TGp, SBp) distal auf BTA09 entdeckt ($P=0,14$), der in der Fleckviehpopulation segregiert. Beim ersten Scan mit 18 GDD-Familien aus 2GDDscan befanden sich 6 Mikrosatellitenmarker auf BTA09. Diese Intervallkartierung gab den ersten Hinweis für einen möglichen QTL mit Effekt auf paternale Totgeburt. Die Abbildung 2 zeigt diese ersten Ergebnisse als Ausgangspunkt für spätere Bestätigungs- und Feinkartierungsstudien.

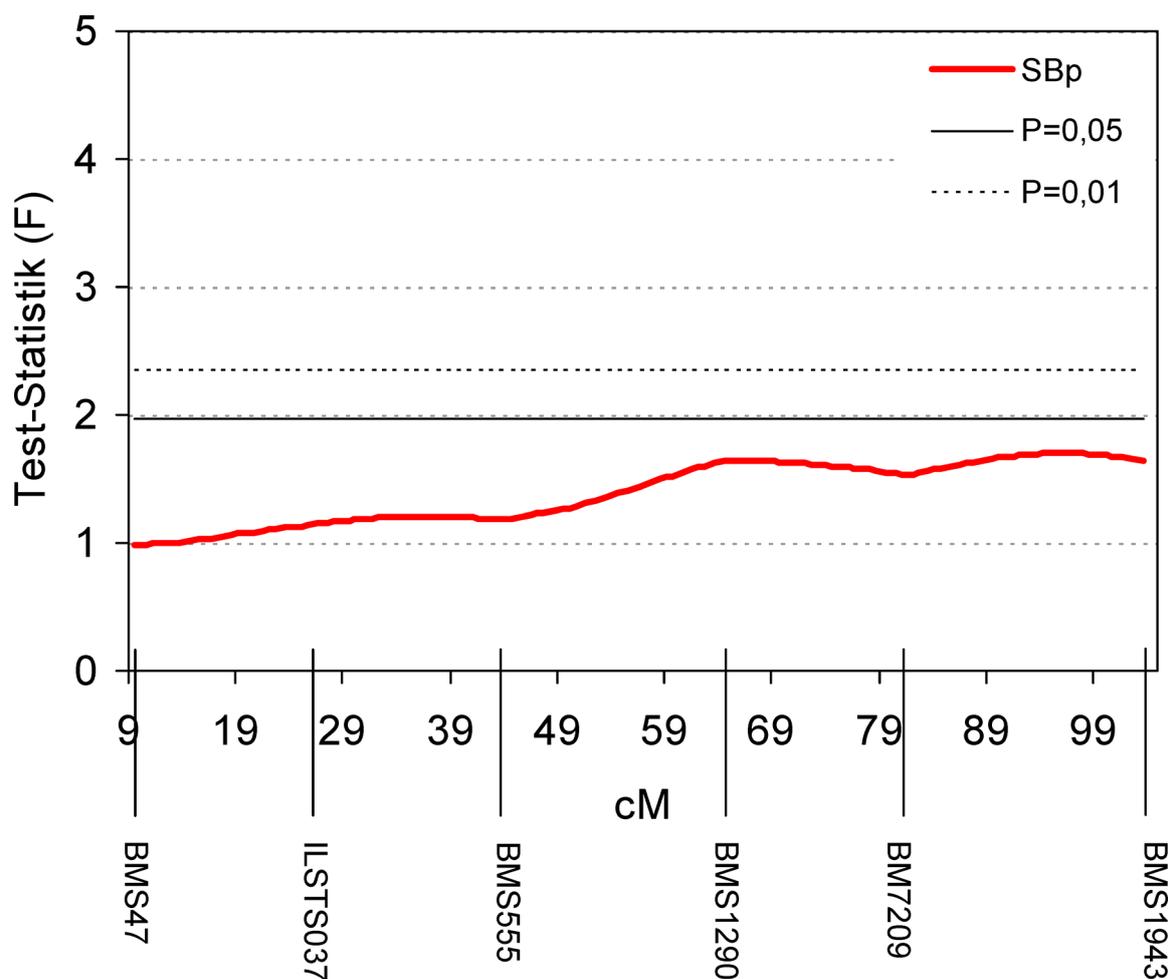


Abbildung 2: Erster Scan für paternale Totgeburt auf BTA09 mit 18 GDD-Familien und 6 Markern.

4.1.1.2 Haplotypisierung des Kernpedigrees auf BTA09

Der 6-Generationen-Kernpedigree (6GP) als wichtiges Verknüpfungselement zwischen den verwendeten Kartierungsdesigns wurde zur Beobachtung der segregierenden Haplotypen in den verschiedenen Familien und Designs mehrmals haplotypisiert.

Die finale Haplotypisierung mit 15 Markern (Marker-Sets *sb* und *gws*) wurde für den 6GP aus 91 Tieren durchgeführt. Die Analyse mit insgesamt 188 Tieren (91 Tiere genotypisiert, 97 Tiere ohne Genotypen als Mütter und Vorfahren zur Verknüpfung der Tiere) wurde mit Hilfe des Programms SimWalk2 durchgeführt und anschließend für 6GP als Haplotypenflussdiagramm grafisch dargestellt. Die grafische Darstellung der segregierenden Haplotypen ermöglicht eine einfache Verfolgung chromosomaler Fragmente von bestimmten Foundern über mehrere Generationen hinweg und kann Aufschluss über den Erbgang möglicher QTL-Allele geben.

Die Familien GDD32 und GDD33 wurden aufgrund segregierender Haplotypen für die Feinkartierung ausgewählt, da die Haplotypen der Familienväter die gleiche paternale Phase im distalen Bereich aufweisen, und deshalb davon ausgegangen werden kann, dass die verschiedenen Familienväter die gleichen QTL-Allele tragen. GDD08, GDD13 und GDD36 wurden aufgrund ihrer verwandtschaftlichen Beziehung zu GDD09 (potentiell heterozygot für den QTL) verwendet.

Außerdem flossen in die Auswahl Ergebnisse aus 18DD ein, das für das Merkmal Proteinprozent untersucht wurde (Ergebnisse werden weiter unten angeführt). Die Familien GDD12, GDD23, GDD27, GDD28 und GDD31 wurden aufgrund Ergebnissen der ersten Scans im 2GDDscan und Ergebnissen im 18DD mit selektivem DNA-Pooling ausgewählt.

In Abbildung 3 sind die segregierenden Haplotypen innerhalb des 6GP dargestellt.

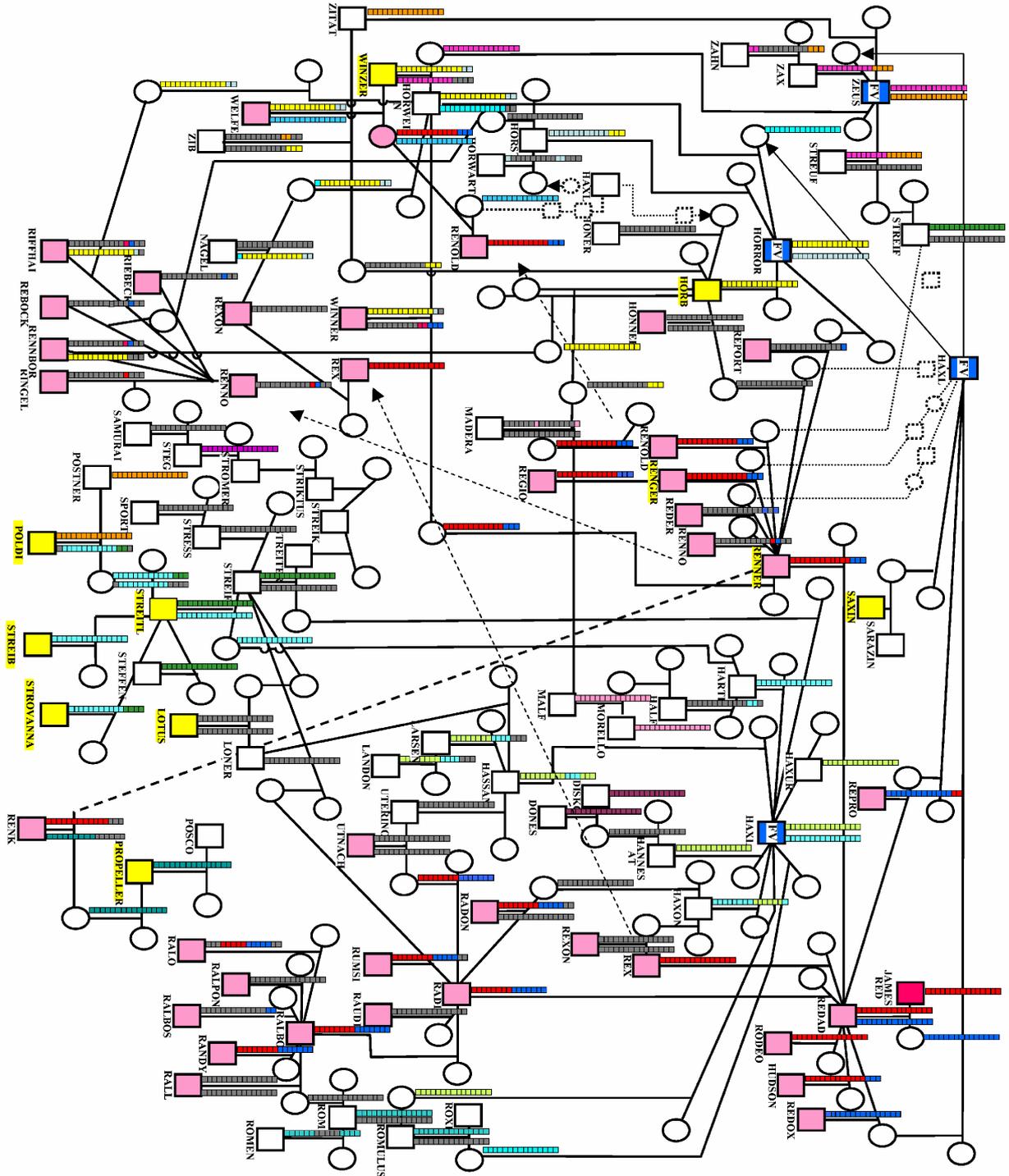


Abbildung 3: Haplotypenflussdiagramm des 6-Generationenpedigrees. Bullen sind als Vierecke, Kühe als Kreise dargestellt. Der linke Haplotyp stammt vom Vater, der rechte von der Mutter. Ein Viereck im Haplotyp repräsentiert einen Marker-Genotyp. Gelb unterlegte Tiere sind Väter im GDD, Fleckvieh-Founder sind blau, Tiere mit Red-Holstein-Blutanteil rot und rosa dargestellt. Rekombinationen sind als Farbwechsel innerhalb eines Haplotyps zu erkennen. Maternal segregierende Haplotypen, die nicht paternalem oder materno-paternalem Ursprung zuzuordnen waren, sind grau dargestellt.

4.1.1.3 Intervallkartierung mit 26 Familien aus 2GDDscan und 11GDD

Kartierung mit dem Achtmerkmalsmodell für TGp und KVp

Nach den ersten Analysen mit 6 Mikrosatellitenmarkern im 2GDDscan wurden weitere 10 Marker zur Bestätigung der Ergebnisse gezielt ausgewählt und genotypisiert.

Erste Intervallkartierungen mit QTLexpress wurden für 26 GDD-Familien (aus Tabelle 3 ersichtlich: Zusammenlegung von Familien aus 2GDDscan und 11GDD) mit 16 Markern durchgeführt. Nicht jede Familie war für alle Marker genotypisiert. Es wurden jedoch nur Familien analysiert, die mit mindestens 5 Markern auf BTA09 vertreten waren. Die QTL für TGp und KVp waren in der Analyse aller Familien nicht signifikant ($P < 0,05$: $P_{TGp} = 0,1039$, $P_{KVp} = 0,0761$, s. Abb. 4).

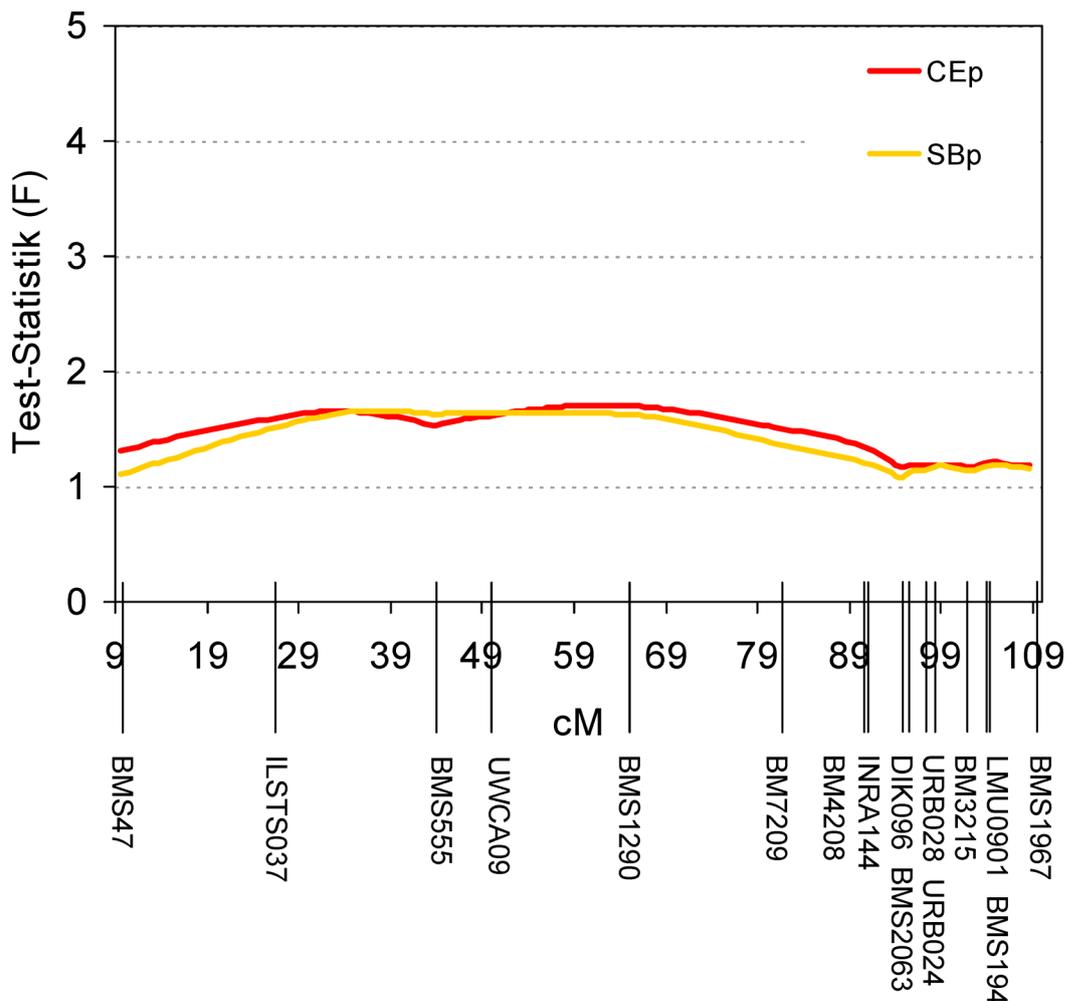


Abbildung 4: Intervallkartierung von 26 GDD-Familien für paternale Totgeburt und paternalen Kalbeverlauf mit 16 Markern auf BTA09 (mind. 5 Marker pro Familie).

Bei der einzelnen Betrachtung der 26 Familien konnte beobachtet werden, dass ein QTL mit epistatischem Effekt für die Merkmale TGp und KVp auf BTA09 segregiert. Ein QTL konnte bei 7 Familien proximal im Markerintervall BMS47 – BMS1290 (9,65 bis 64,935 cM) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,01$ und einem Maximum zwischen ILSTS037 und BMS555 (26,266 bis 43,818 cM) kartiert werden (s. Abbildung 5).

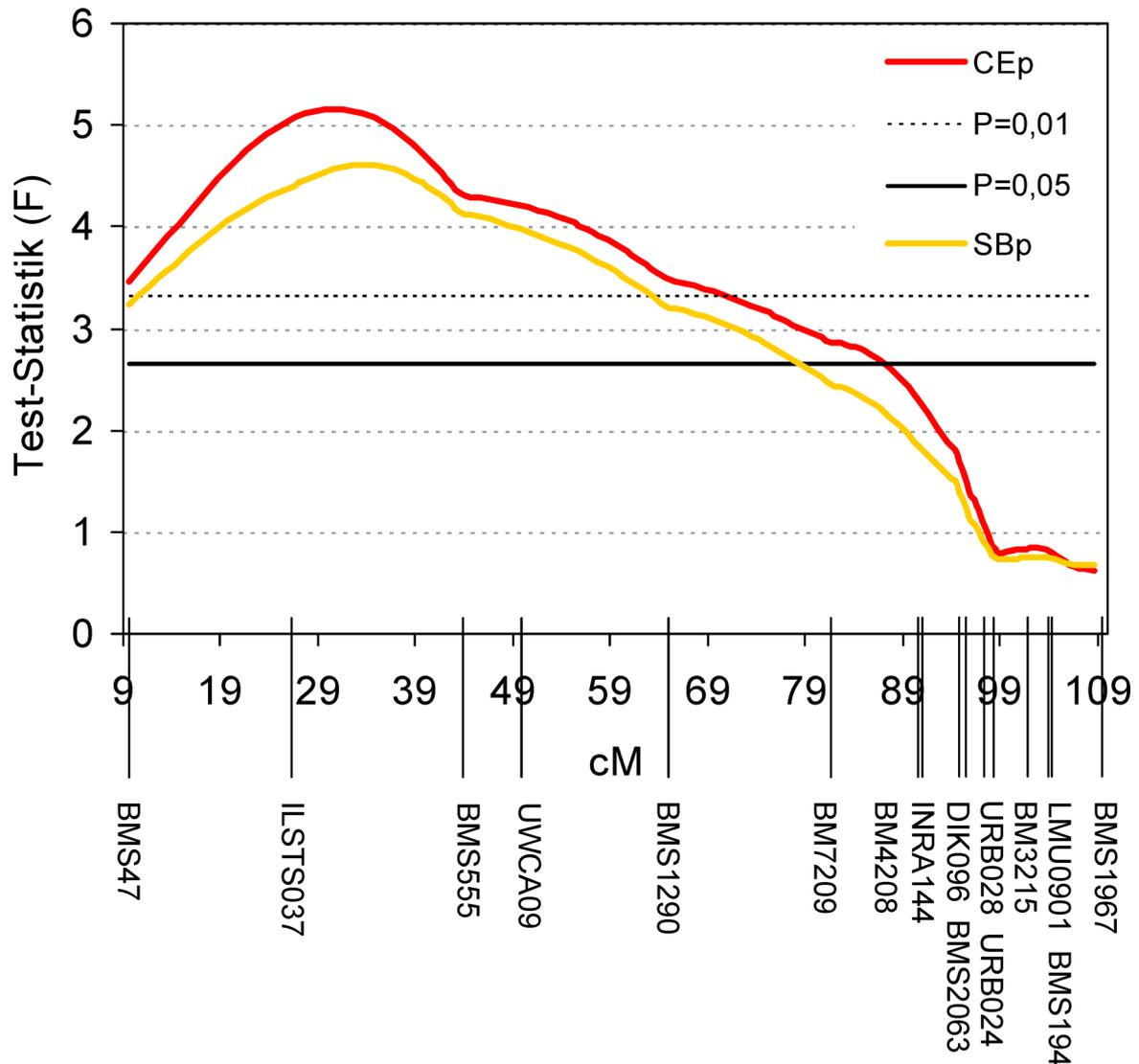


Abbildung 5: Proximaler QTL zwischen BMS47 und BMS1290 für die Merkmale TGp und KVp.

Ein weiterer QTL segregiert bei acht Familien in den distalen Bereich des Chromosoms zwischen DIK096 und BMS1967 (94,803 bis 109,287 cM, s. Abb. 6). Das Maximum liegt bei diesem QTL im Intervall URB028 – LMU0901 (98,219 bis 103,70 cM) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$.

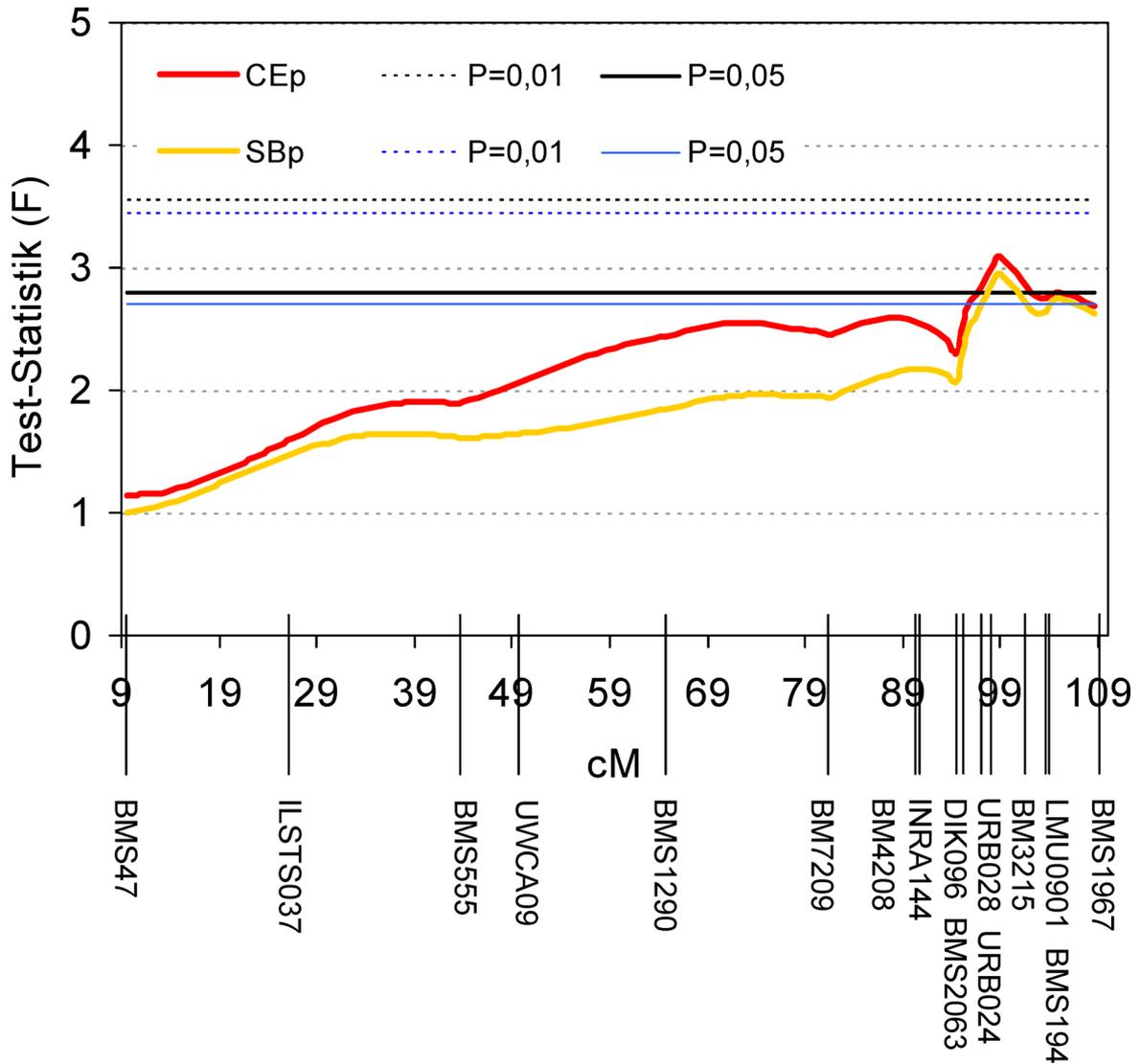


Abbildung 6: Distaler QTL für KVp und TGp zwischen URB028 und LMU0901.

Kartierung mit dem Einmerkmalsmodell für TGp und KVp

Eine vergleichende Analyse des distalen QTL für TGp bei sechs Familien mit Achtmerkmalsmodell- und Einmerkmalsmodell-Zuchtwerten (MMM und EMM) ergab, dass mit Einmerkmalsmodell-Zuchtwerten eine höhere Signifikanz ($P < 0,01$) des QTL erreicht werden kann und diese Zuchtwerte bessere Kartierungsergebnisse liefern (s. Abb. 7). Die Zuchtwerte für paternale und maternale Totgeburt, paternaler und maternaler Kalbeverlauf, jeweils für die erste und zweite Abkalbung sowie alle Abkalbungen zusammen, wurden für die gesamte deutsch-österreichische Fleckviehpopulation von der ZuchtData GmbH Wien berechnet.

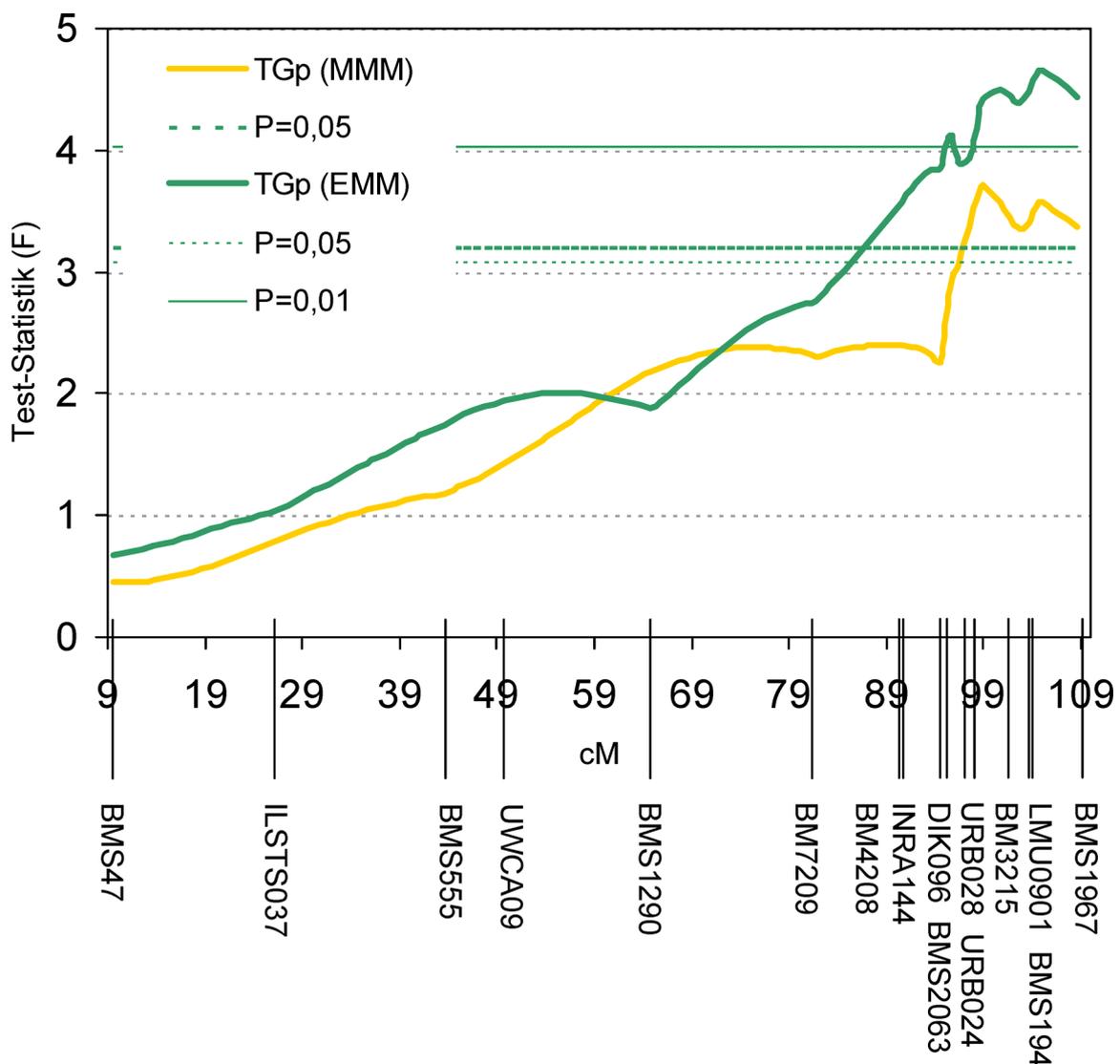


Abbildung 7: Vergleichende Kartierung mit Einmerkmalsmodell-Zuchtwerten (EMM) und Achtmerkmalsmodell-Zuchtwerten (MMM) bei sechs Familien.

4.1.1.4 Feinkartierung für die Merkmale TGp und KVp mit 11GDD

Kopplungskarte

Die Feinkartierung der Merkmale paternale Totgeburt und paternaler Kalbeverlauf wurde mit 11GDD durchgeführt. Die Tiere wurden mit 33 Markern auf BTA09 genotypisiert. Von ursprünglich 35 ausgewählten und typisierten Markern wurden 2 Marker (BMS1319 und LMU0903) aufgrund inkonsistenter Genotypisierungsergebnisse von den Analysen ausgeschlossen. Das durchschnittliche Markerintervall beträgt 3,5 cM bei einer Gesamtlänge des Chromosoms von ca. 116 cM (zur Übersicht s. Abb. 8).

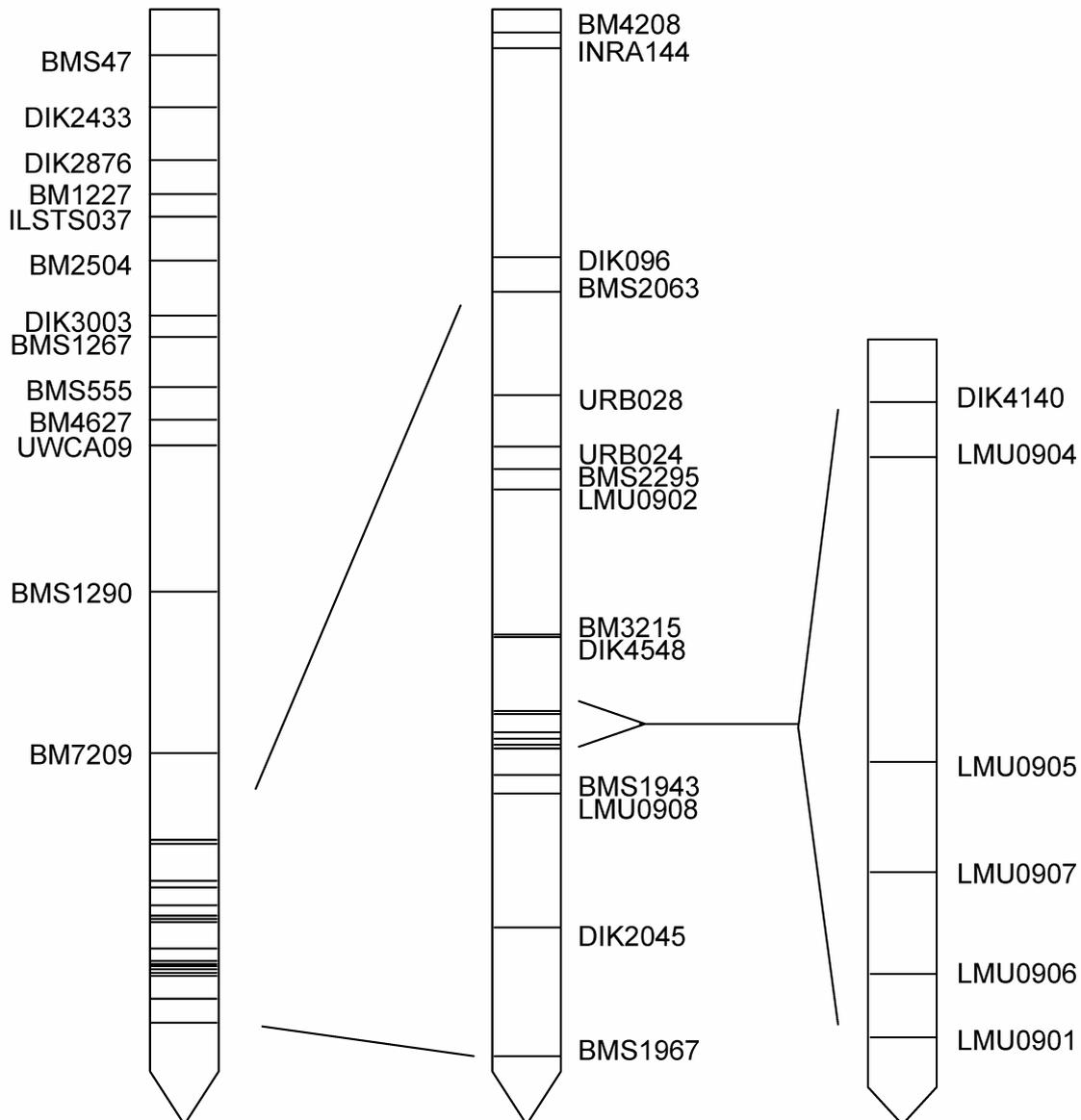


Abbildung 8: Verteilung der 33 Marker auf BTA09 mit vergrößerter Übersicht der 20 Marker auf den distalen 30 cM. Die Distanzen zwischen den Markern sind maßstabsgetreu abgebildet.

Intervallkartierung mit dem Achtmerkmalsmodell im 11GDD

Bei der gemeinsamen Analyse mit QTLexpress aller 11 Familien ergibt sich mit 33 Markern ein hochsignifikanter QTL für TGp und KVp im proximalen Bereich von BTA09. Der QTL für TGp und KVp liegt im Markerintervall DIK2876 – BMS1267 mit einem Test-Statistik-Wert von $F=3,29$ (KVp) bzw. $F=3,1$ (TGp) und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P<0,01$. Der maximale F-Wert liegt im Markerintervall BM2504 – DIK3003. Der distale QTL war in der QTL-Kartierung mit 11 Familien nicht signifikant (s. Abb. 9). Als phänotypische Beobachtungen dienten Zuchtwerte vom August 2006.

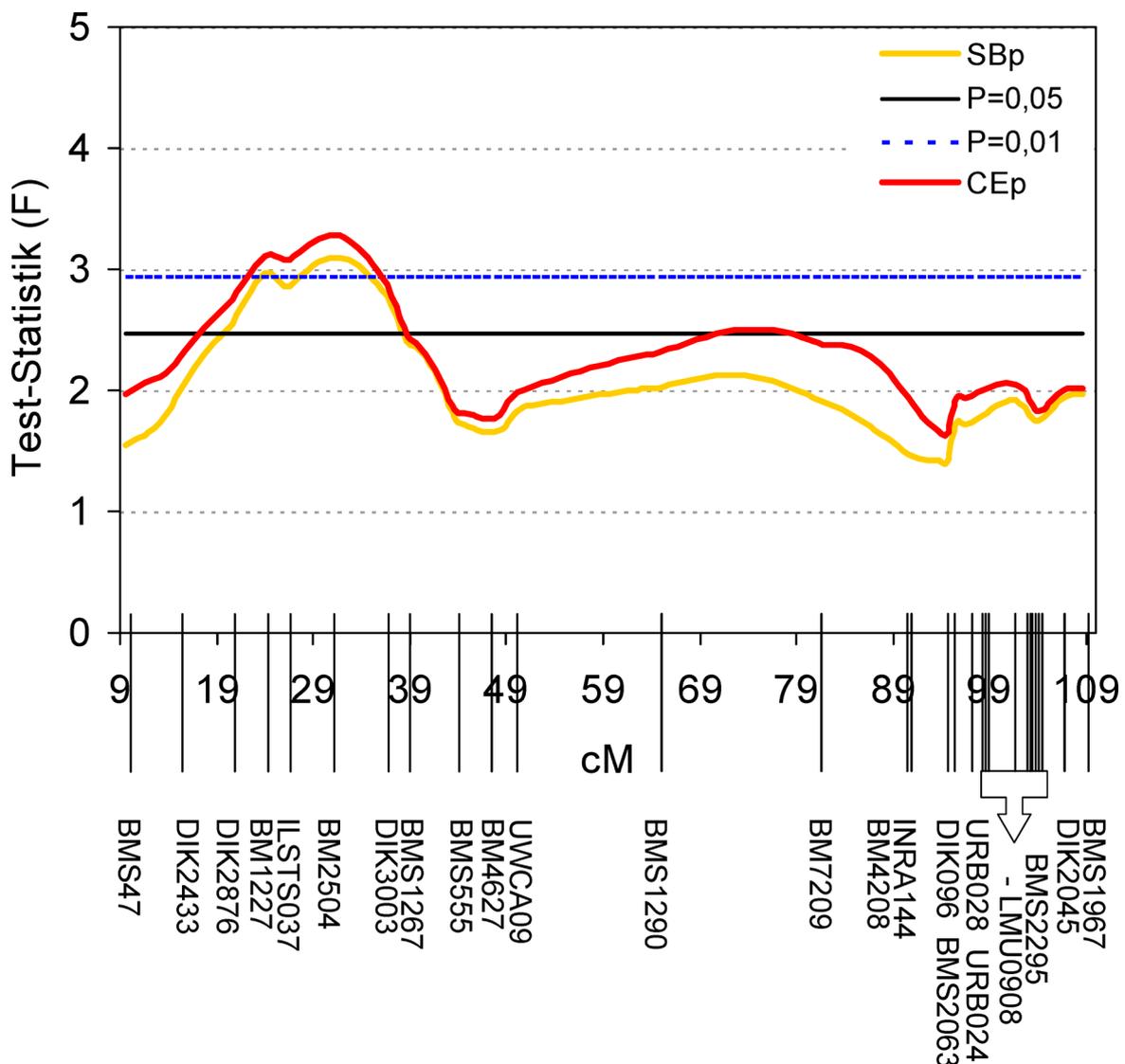


Abbildung 9: Intervallkartierung aller 11GDD-Familien. Aus Gründen der Übersicht wird das Markerintervall von BMS2296 bis LMU0908 als Pfeil dargestellt (Marker und Distanzen in diesem Intervall wie in Tabelle 9 oder Abbildung 8).

Die getrennte Analyse der elf Familien ergibt, dass sich auf BTA09 zwei QTL für KVp/TGp befinden, ein QTL im proximalen und einer im distalen Bereich des Chromosoms. Die Familien Lotus (GDD13), Horb (GDD23) und Renger (GDD31) weisen signifikante P -Werte für KVp und/oder TGp auf. Die Teststatistik F der Familien Saxin (GDD08), Streitl (GDD09), Propeller (GDD27) und Poldi (GDD36) erreichte $P < 0,05$ nicht, die Familien waren jedoch hinweisend auf einen QTL und wurden in weitere Analysen miteinbezogen (s. Tabelle 11). Die im Achtmerkmalsmodell korrelierten Merkmale KVp und TGp wiesen in allen Familien eine lineare Beziehung mit ähnlichen P -Werten und Teststatistik-Werten auf.

Tabelle 11: Intervallkartierungsergebnisse der Einzelfamilien. Alle 11 Familien mit Irrtumswahrscheinlichkeiten (P -Werten) und entsprechender Test-Statistik (F). Kartierung mit QTLexpress, 33 Marker. Die in den weiteren Analysen verwendeten Familien und signifikante Test-Statistik-Werte sind Fett dargestellt, indikative Test-Statistik-Werte kursiv.

Familie:		Totgeburt paternal:			Kalbeverlauf paternal:		
Nummer	Vater	Test-Statistik (F)	$P=0,05$	$P=0,01$	Test-Statistik (F)	$P=0,05$	$P=0,01$
GDD08	Saxin	2,66	8,37	14,25	2,76	8,43	14,75
GDD09	Streitl	6,11	6,88	10,23	6,33	6,73	10,21
GDD12	Renner	2,02	6,48	9,71	2,81	6,94	10,97
GDD13	Lotus	10,98	8,31	12,96	9,13	8,23	13,40
GDD23	Horb	6,26	7,45	11,24	10,64	7,61	11,71
GDD27	Propeller	5,32	7,19	11,32	4,21	6,48	9,54
GDD28	Winzer	1,96	8,27	12,09	1,55	8,43	12,79
GDD31	Renger	10,60	6,67	10,59	8,73	6,83	10,36
GDD32	Strovanna	3,60	7,11	10,99	2,48	7,30	11,21
GDD33	Streib	3,84	9,57	16,39	4,54	9,74	17,15
GDD36	Poldi	5,48	6,34	10,11	6,06	6,53	9,89

Intervallkartierung des proximalen QTL für KVp und TGp (Achtmerkmalsmodell)

Bei der gemeinsamen Intervallkartierung von 4 Familien mit einem signifikanten oder indikativen Kartierungsergebnis für den proximalen QTL (GDD13 Lotus, GDD23 Horb, GDD31 Renger und GDD09 Streitl) beträgt der F-Wert für TGp 6,77 für KVp 6,61, dies entspricht *P*-Werten von 0,0002 (TGp) und 0,0003 (KVp). Der QTL im proximalen Bereich erstreckt sich im Markerintervall von BMS47 bis BMS555 über 34,2 cM und ist sowohl für TGp und KVp hochsignifikant (s. Abb. 10).

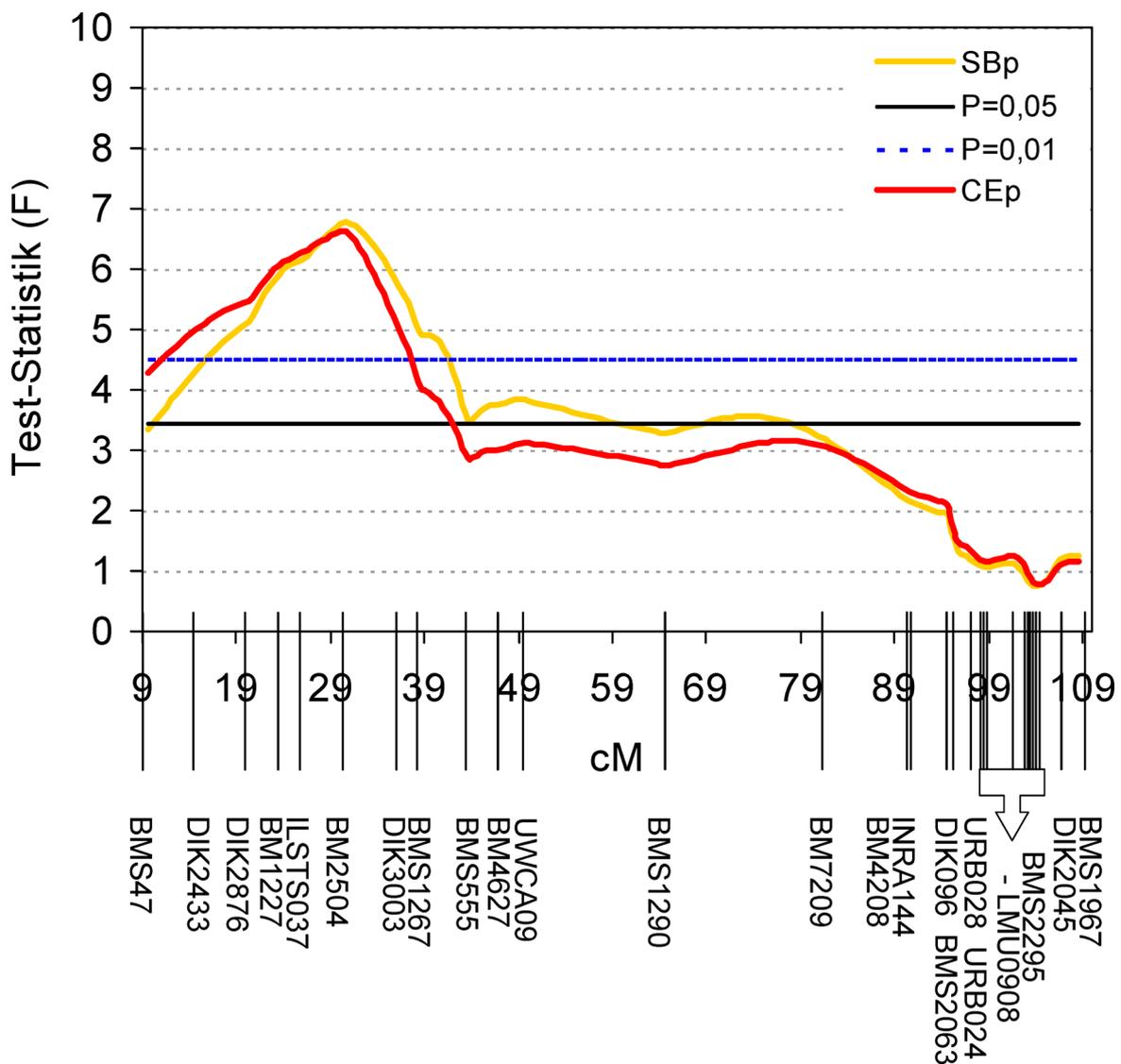


Abbildung 10: Intervallkartierung mit den GDD-Familien Lotus, Horb, Renger und Streib.

Intervallkartierung des distalen QTL für KVp und TGp (Achtmerkmalsmodell)

Auswertungen des distalen QTL mit dem Achtmerkmalsmodell in 5 Familien (GDD08 Saxin, GDD09 Streitl, GDD27 Propeller, GDD33 Streib und GDD36 Poldi) ergeben einen F-Wert von 3,84 (TGp) und 3,7 (KVp), was signifikante P -Werte von 0,025 für paternale Totgeburt, und 0,02 für paternalen Kalbeverlauf ergibt ($0,01 < P < 0,05$). Dieser QTL überschreitet die Signifikanzschwelle von $P=0,05$ auf einer Distanz von 12 cM im Markerintervall URB028 – BMS1967 mit einem maximalen F-Wert zwischen DIK2045 und BMS1967 (s. Abb. 11).

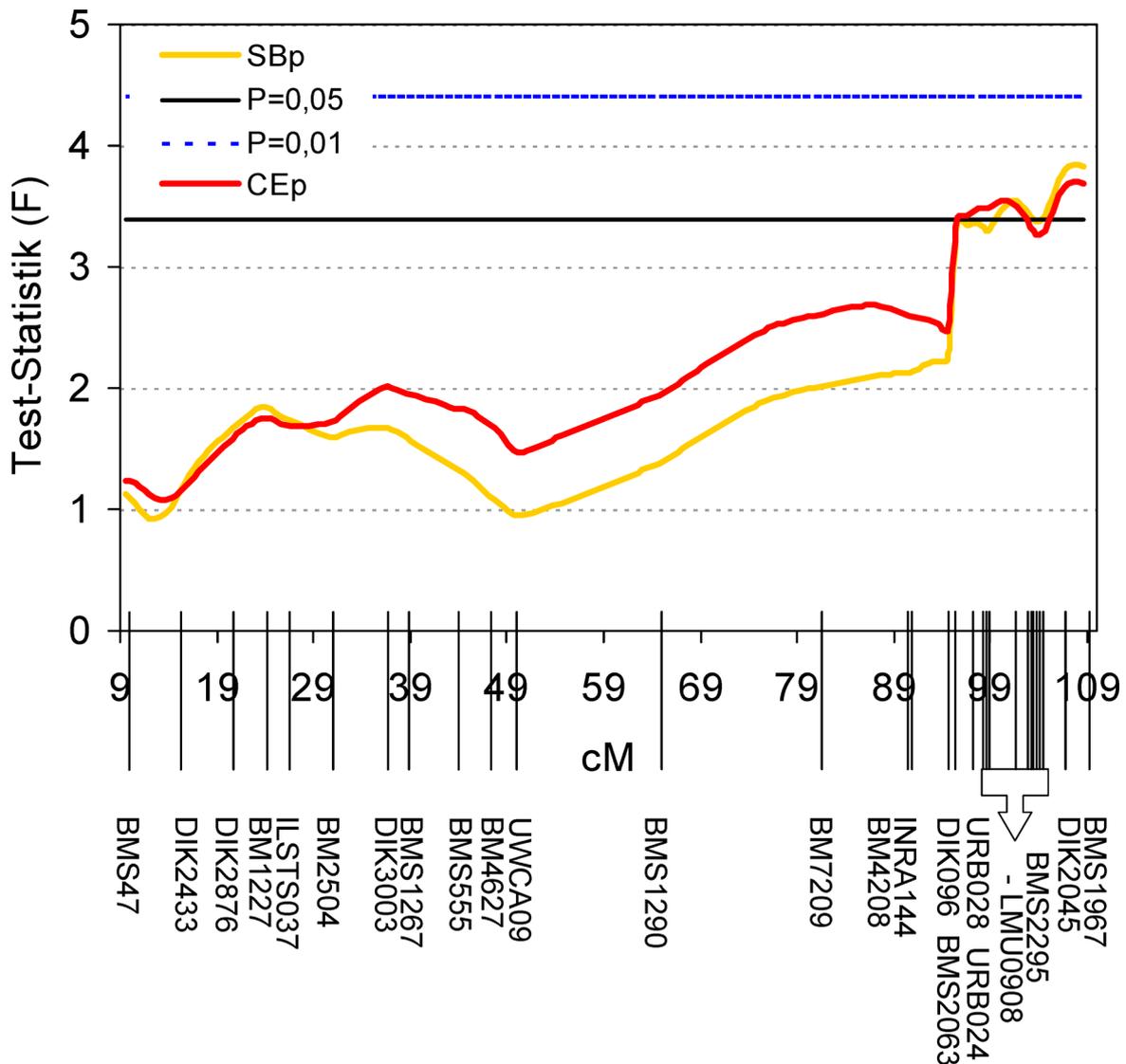


Abbildung 11: Intervallkartierung mit den Familien Saxin, Streitl, Propeller, Streib und Poldi.

Intervallkartierung mit dem Einmerkmalsmodell im 11GDD

Die Intervallkartierung mit unkorrelierten Zuchtwerten (Einmerkmalsmodell) von August 2006 mit QTLexpress für alle 11 GDD-Familien ergab in der Analyse über alle Familien keine signifikante QTL für paternale Totgeburt oder paternalen Kalbeverlauf. Wie bei der Intervallkartierung im Achtmerkmalsmodell wurden alle 11 Familien des 11GDD einzeln analysiert. Wie zuvor stellten sich zwei QTL mit Effekt auf KVp/TGp im proximalen und distalen Bereich des Chromosoms dar. Im Gegensatz zu den Kartierungsergebnissen mit dem Achtmerkmalsmodell verliefen die Kurven aufgrund der Vernachlässigung von genetischen Korrelationen in dieser Auswertung nicht parallel. Es ergaben sich Unterschiede in der Signifikanz für die Untergruppen innerhalb der Merkmale (KVp, KVp1, KVp2, TGp, TGp1, TGp2) auch innerhalb einzelner Familien. Zum Beispiel war GDD23 für den proximalen QTL mit Effekt auf TGp und TGp2 signifikant, nicht jedoch für TGp1 oder ein Merkmal des Kalbeverlaufs. Deswegen wurden alle Familien für alle Merkmale einzeln betrachtet und anschließend nach proximalem und distalem QTL für das jeweilige Merkmal zusammen analysiert (s. Tabelle 12). Eine Familie wurde einer Gruppe zugeteilt, wenn sie in einer Untergruppe eines Merkmals (TGp oder KVp) signifikant oder indikativ für einen QTL war.

Für KVp wurden für den proximalen QTL die Familien GDD31 und GDD33, und für den distalen QTL die Familien GDD09, GDD12 und GDD27 gemeinsam ausgewertet. Für TGp wurden die Familien GDD23 und GDD31 für den proximalen QTL in der Intervallkartierung gruppiert, die Familien GDD27, GDD28 und GDD32 bildeten eine Gruppe für den distalen QTL (s. Tabelle 12, Abb. 12 und 13).

Tabelle 12: *P*-Werte der gemeinsamen Analyse einzelner Familien für paternalen Kalbeverlauf und paternale Totgeburt. Die hellgrau schattierten Felder sind mit $P < 0,05$ signifikant, dunkelgrau schattierte Felder sind mit $P < 0,01$ hochsignifikant.

	KVp	KVp1	KVp2	Markerintervall
prox (GDD31, GDD33)	0,1282	0,7788	0,0039	DIK2876 – BMS1267
distal (GDD09, GDD12, GDD27)	0,0077	0,0052	0,0503	LMU0902 – LMU0906
	TGp	TGp1	TGp2	Markerintervall
proximal (GDD23, GDD31)	0,0376	0,3115	0,033	BMS47 – DIK2876
distal (GDD27, GDD28, GDD32)	0,0344	0,0025	0,3401	BM3215 – DIK2045

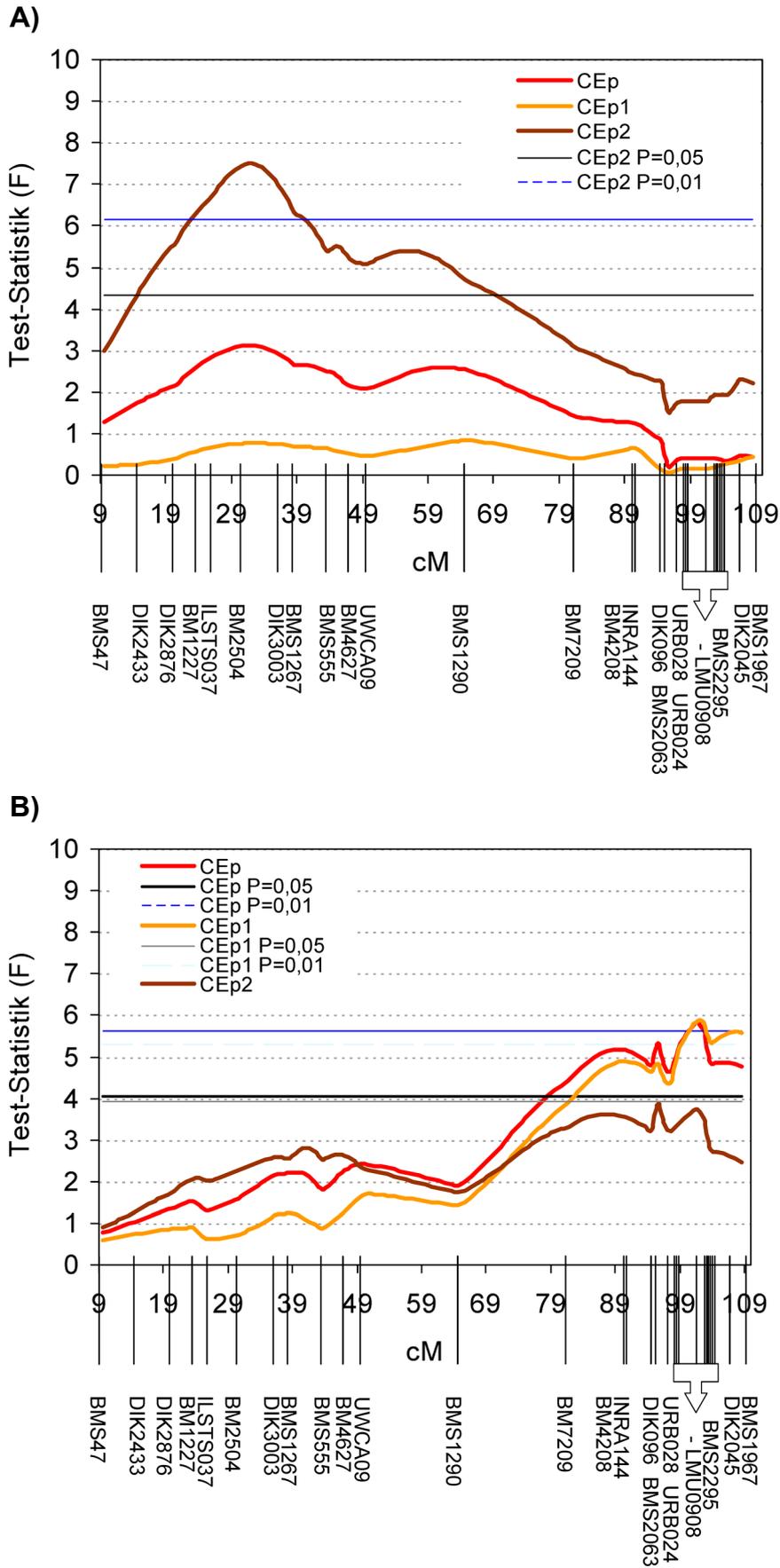


Abbildung 12: Intervallkartierung mit dem Einmerkmalsmodell für den QTL mit Effekt auf KVp:
 A) Intervallkartierung des proximalen QTL, B) Intervallkartierung des distalen QTL

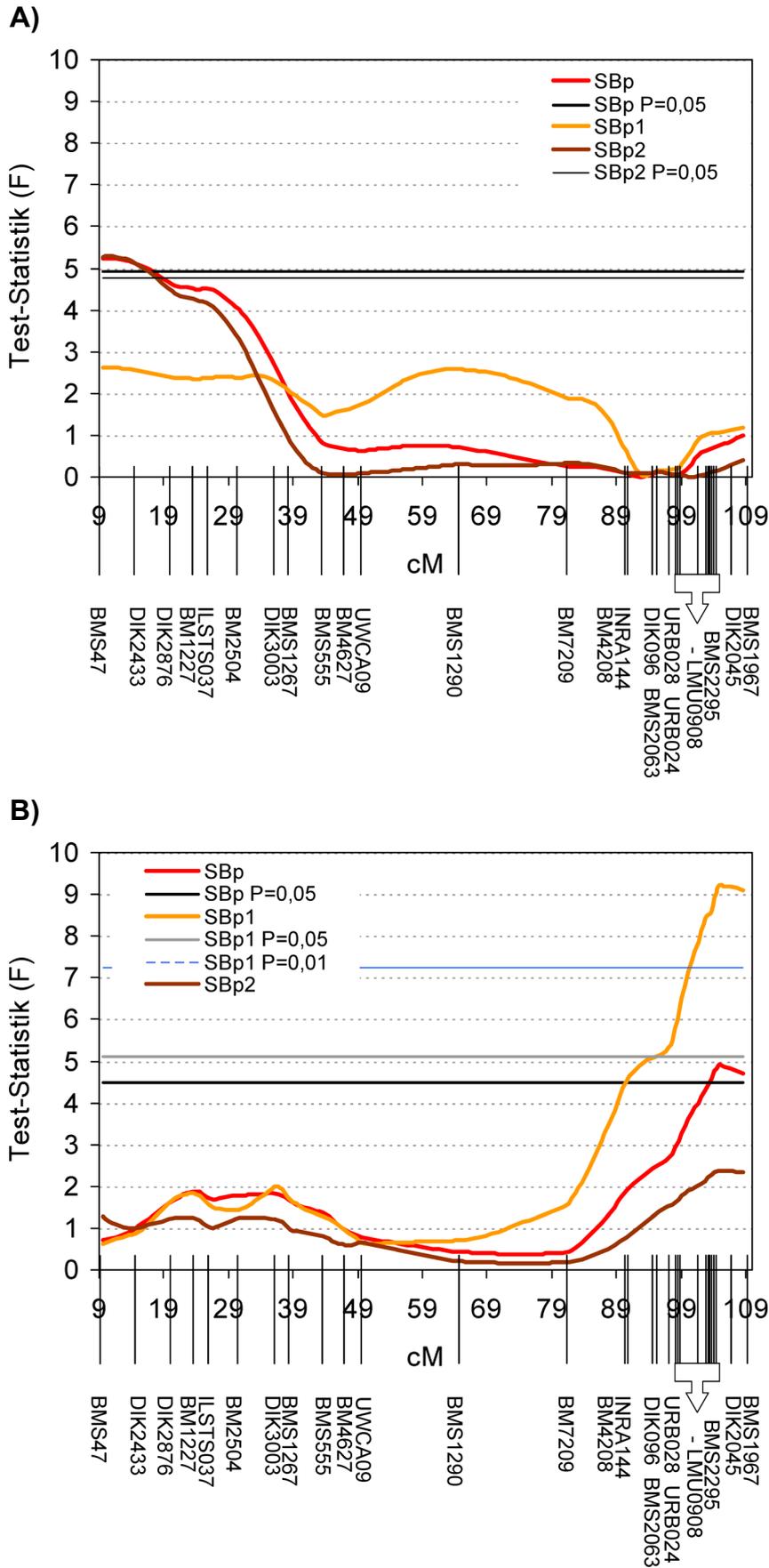


Abbildung 13: Intervallkartierung mit dem Einmerkmalsmodell für den QTL mit Effekt auf TGp:
 A) Intervallkartierung des proximalen QTL, B) Intervallkartierung des distalen QTL

Feinkartierung mit Linkage Disequilibrium / Linkage (Achtmerkmalsmodell)

Die Feinkartierung wurde für 11GDD zusätzlich mit einer kombinierten Kopplungs- und Kopplungsungleichgewichts-Analyse (LDLrams1.76) im CPD mit insgesamt 1253 Tieren durchgeführt. Mit dieser Methode können QTL auf weniger als 1 cM kartiert werden. Der QTL kann auf sehr kleine Markerintervalle begrenzt werden, was die Suche nach Kandidatengenomen erheblich erleichtern soll.

Die Analyse mit durchschnittlichen Haplotypen aus Markov Chain Monte Carlo (MCMC) durch das Programm LDLrams1.76 ergab einen signifikanten QTL für KVp mit einer Likelihood Ratio (LR) von 10,14. Die Likelihood Ratio folgt einer CHI-quadrat Verteilung mit einem Freiheitsgrad (Olsen et al., 2004). Daraus resultiert ein P -Wert von $P=0,00145$ bei einem maximalen LOD-score von 2,20. Dieser wird bei 103,685 cM erreicht, dem Markerintervall zwischen LMU0906 und LMU0901. Für TGp beträgt die Likelihood Ratio 2,211, der P -Wert beläuft sich auf $P=0,137$ (s. Abb. 14). Im Gegensatz zu vorherigen Analysen wird hier sehr viel deutlicher, dass es sich um einen QTL mit primärem Effekt auf KVp und sekundärem Effekt auf TGp handelt.

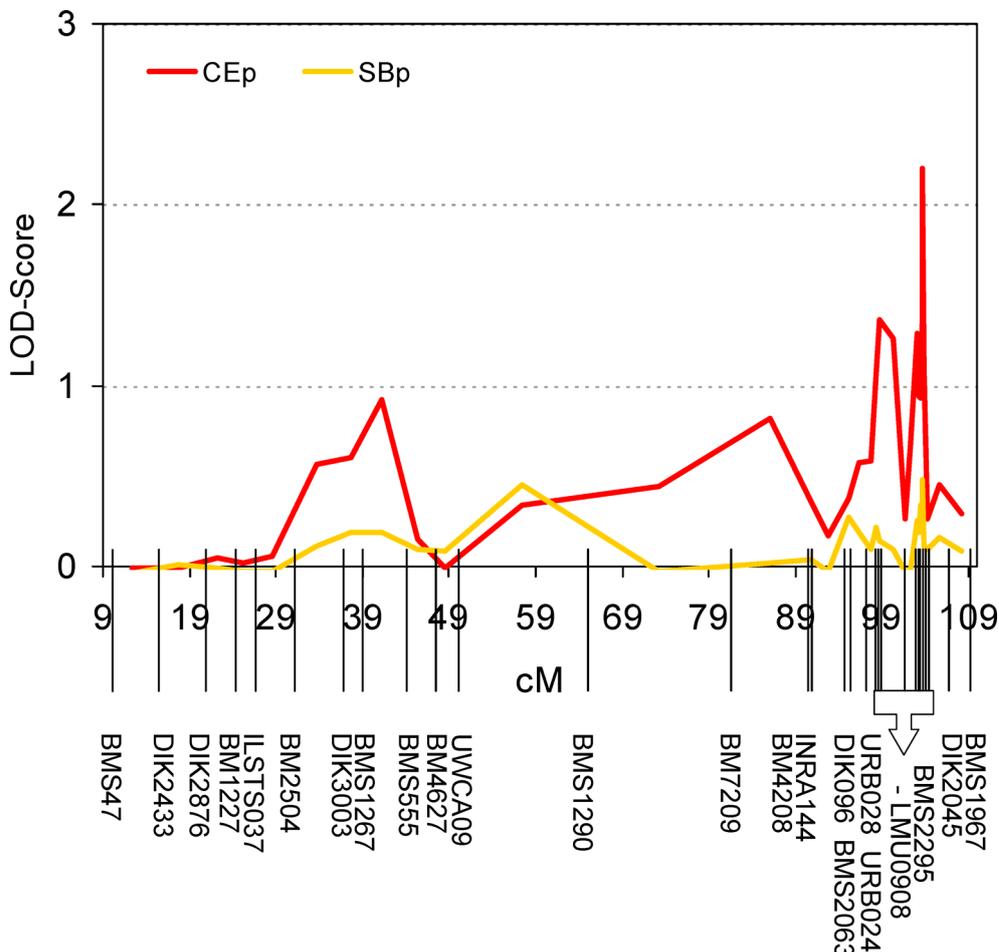


Abbildung 14: QTL-Kartierung mit Linkage Disequilibrium / Linkage, Achtmerkmalsmodell

Feinkartierung mit LDL und wahrscheinlichsten Haplotypen (Einmerkmalsmodell und Achtmerkmalsmodell) für KVp und TGp

Wie schon in Kapitel 3.4.2.5 beschrieben, wurde die Feinkartierung mit Linkage Disequilibrium / Linkage mit den wahrscheinlichsten Haplotypen und dem Programm LDL1.42 durchgeführt. Die verwendeten Haplotypen wurden mit dem Programm SimWalk2 ermittelt und mit Datenbankanwendungen sowie manuell vorbereitet. In der Regel berechnet das Programm für die überlappenden Subpedigrees gleiche Haplotypen für mehrmals in verschiedenen Subpedigrees vorkommende Tiere. Nur etwa 3% der Haplotypen waren nicht identisch. Dabei handelte es sich hauptsächlich um die Haplotypen von Foundern ohne genotypisierten Vater und Mutter. Hier entscheidet das Programm willkürlich, welcher Haplotyp von welchem Elternteil stammt. Diese Unstimmigkeiten wurden als irrelevant betrachtet. In weniger als 1% der Fälle waren die Haplotypen tatsächlich unterschiedlich. Hierbei waren meistens Tiere betroffen, die im jeweiligen Subpedigree schlecht mit den restlichen Tieren verknüpft waren. Dadurch wurden teilweise Rekombinationen an unterschiedlichen Stellen berechnet. In diesen Fällen wurden diejenigen Haplotypen verwendet, die in mehreren Subpedigrees identisch waren.

In der LDL-Kartierung mit LDL1.42 wurden Phänotypen für paternalen Kalbeverlauf (CEp, KVp) aus unkorrelierten Einmerkmalsmodell-Zuchtwerten für alle Abkalbungen (CEpEM), 1. (CEpEM1) und 2. Abkalbung (CEpEM2) sowie konventionelle Achtmerkmalsmodell-Zuchtwerte (CEpMM) verwendet und getrennt betrachtet.

Die Kartierung mit LDL1.42 und den wahrscheinlichsten Haplotypen aus SimWalk2 ergab für das Merkmal Kalbeverlauf paternal für CEpMM einen P -Wert von $P=0,026$ bei 17,768 cM und $P=0,04$ bei 103,685 cM für CEpEM. CEpEM 1 hatte einen P -Wert von 0,03 bei 103,59 cM und CEpEM2 war mit $P=0,003$ bei 17,768 cM hochsignifikant (s. Abb. 15).

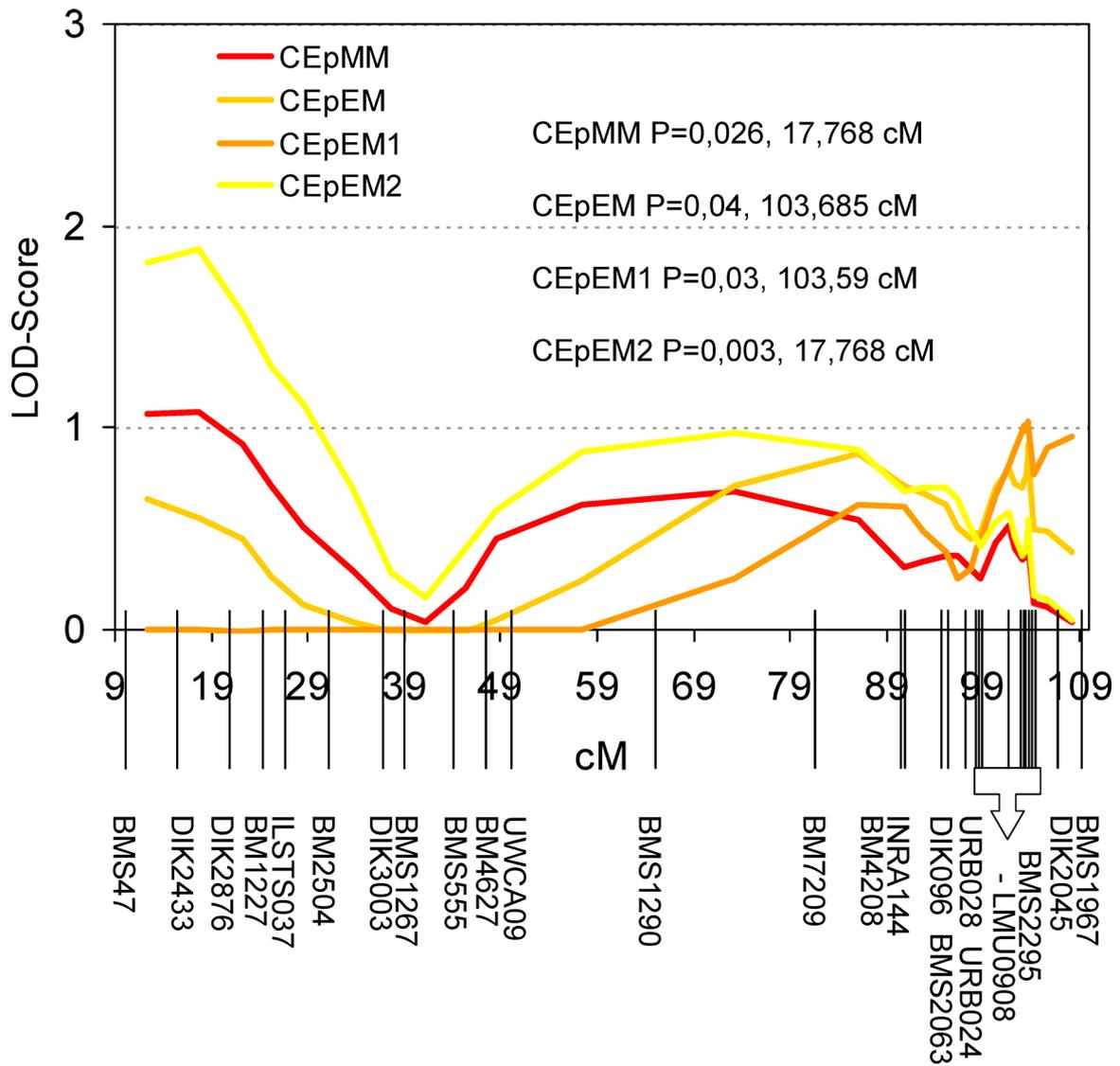


Abbildung 15: LDL-Kartierung mit wahrscheinlichsten Haplotypen für das Merkmal paternalen Kalbeverlauf (Ein- und Achtmerkmalsmodell) in 11GDD.

Die Auswertungen mit Ein- und Achtmerkmalsmodell-Zuchtwerten und wahrscheinlichsten Haplotypen für paternale Totgeburt weisen nur einen signifikanten QTL für SBp bei der ersten Abkalbung (SBpEM1) mit $P=0,029$ bei 90,835 cM auf. SBpEM und SBpEM2 sind nicht signifikant. Im Achtmerkmalsmodell (SBpMM) war das Ergebnis mit $P=0,054$ bei 12,387 cM hinweisend auf einen QTL (s. Abb. 15).

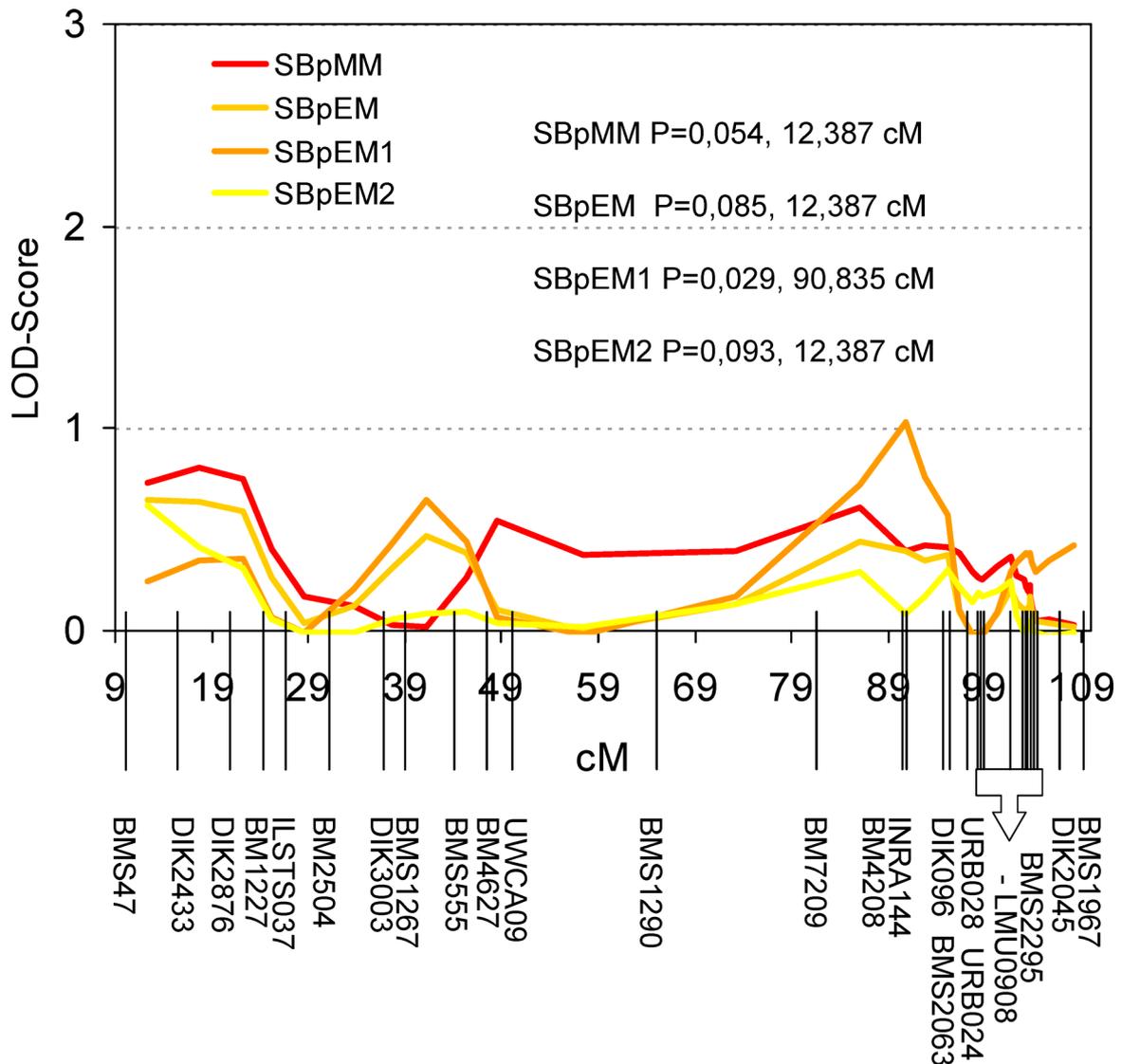


Abbildung 16: QTL-Feinkartierung für paternale Totgeburt mit der LDL-Kartierung und wahrscheinlichsten Haplotypen.

4.1.2 QTL-Kartierung für Proteinprozent

4.1.2.1 Erster Scan für Proteinprozent

Beim ersten Scan mit 2GDDscan und anschließender Reanalyse mit neueren Zuchtwerten konnte auf Chromosom 9 neben den zwei QTL für TGp und KVp ein QTL für Proteinprozent (PP) entdeckt werden. In der Reanalyse wurden alle Milchleistungsmerkmale und Merkmale für Fruchtbarkeit und Kalbeverlauf betrachtet. Mögliche weitere QTL können aufgrund epistatischer Effekte vorhanden sein, Aufschlüsse über potentielle Kandidatengene geben oder eine Erklärung für mögliche unerwünschte Effekte liefern (Introgression eines QTL mit unerwünschtem Effekt durch Kopplung mit einem Merkmal, auf das selektiert wird).

Für GDD36 (Poldi) lagen im August 2006 noch keine Zuchtwerte für Milchleistungsmerkmale vor. Diese relativ junge Familie hat bereits Zuchtwerte von Kalbmerkmalen durch Nachkommen der Söhne, jedoch haben die Enkeltöchter von Poldi noch keine Eigenleistungen erzielt. Deshalb liegen keine Zuchtwerte für Milchleistungsmerkmale vor.

Bei der Reanalyse von 24 Familien mit 16 Markern schien nur ein QTL für PP im proximalen Bereich zwischen ILSTS037 und BMS1290 zu kartieren (s. Abb. 17).

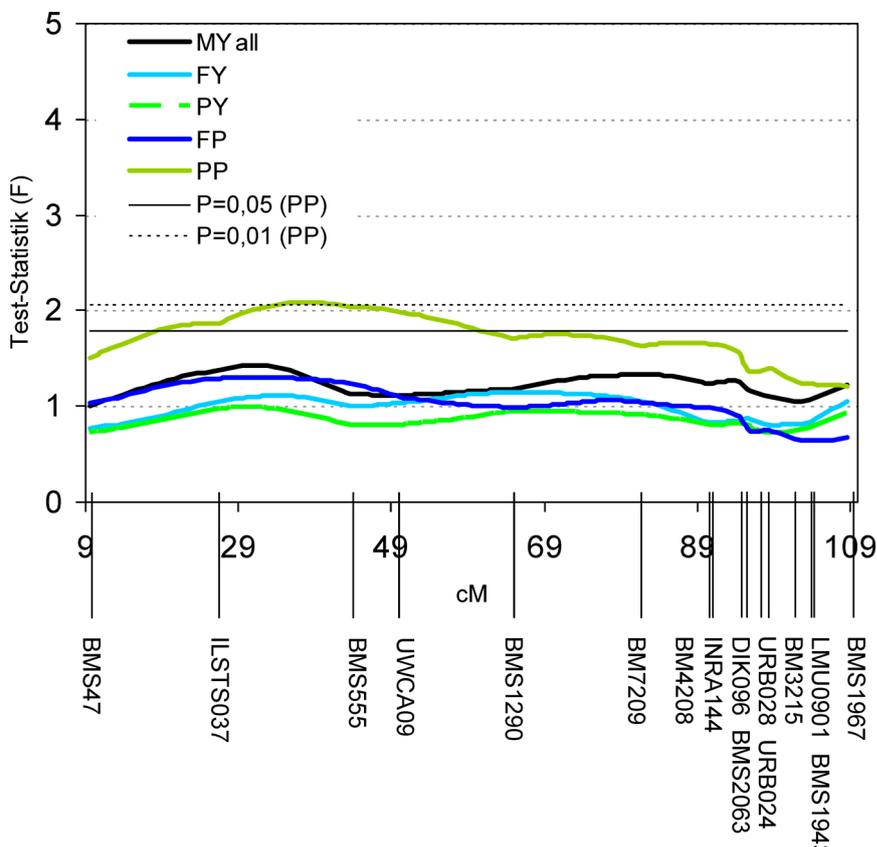


Abbildung 17: Intervallkartierung von 24 Familien für Milchmerkmale mit 16 Markern.

Wie bereits für die Merkmale KVp und TGp durchgeführt, wurden auch hier alle Familien einzeln analysiert um einen detaillierten Einblick zu erhalten.

Bei der familienweisen Analyse kamen wieder zwei QTL zum Vorschein. In 5 Familien segregiert der proximale QTL (GDD12, GDD 17, GDD19, GDD20, GDD23), in 3 Familien der distale QTL (GDD02, GDD09, GDD12) (s. Tabelle 13). Die Familie GDD28 wurde aufgrund eines indikativen Ergebnisses in die Auswertung der Gruppe mit distalem QTL hinzugenommen. Beide QTL weisen in der Analyse mit gruppierten Familien eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,001$ auf (s. Abb. 18). Bei 12 Familien wurde aufgrund sehr niedriger F-Statistik-Werte auf eine Permutationsanalyse verzichtet.

Tabelle 13: Übersicht: 24 Familien im genomweiten Scan mit mindestens 5 Markern. Familien mit signifikantem proximalen QTL sind grau unterlegt, Familien mit signifikantem distalen QTL dunkelgrau.

Familie	Merkmal	cM	Markerintervall	F-statistic	P-Wert	Anzahl typ. Marker
GDD01	PP	16	BMS47-ILSTS037	1,52	0,5136	4
GDD02	PP	99	URB024-BM3215	6,15	0,0485	6
GDD08	PP	95	DIK096-BMS2063	2,15	0,4922	17
GDD09	PP	105	BMS1943-DIK2045	7,23	0,0401	17
GDD12	PP	37	ILSTS037-BMS555	9,05	0,0211	17
GDD12	PP	99	URB024-BM3215	9,05	0,0211	17
GDD13	PP			n.s		17
GDD14	PP			n.s		6
GDD16	PP	62	BMS555-BMS1290	3,76	0,1899	6
GDD17	PP	27	ILSTS037-BMS555	8,18	0,0162	6
GDD18	PP			n.s		6
GDD19	PP	40	ILSTS037-BMS555	20,52	<0,0001	6
GDD20	PP	31	ILSTS037-BMS555	8,15	0,0247	6
GDD21	PP			n.s		6
GDD22	PP			n.s		5
GDD23	PP	53	BMS555-BMS1290	11,07	0,0063	5
GDD24	PP			n.s		4
GDD25	PP			n.s		5
GDD26	PP			n.s		5
GDD27	PP			n.s		17
GDD28	PP	104	LMU0901-BMS1943	3,22	0,3086	17
GDD31	PP			n.s		17
GDD32	PP			n.s		17
GDD33	PP			n.s		17

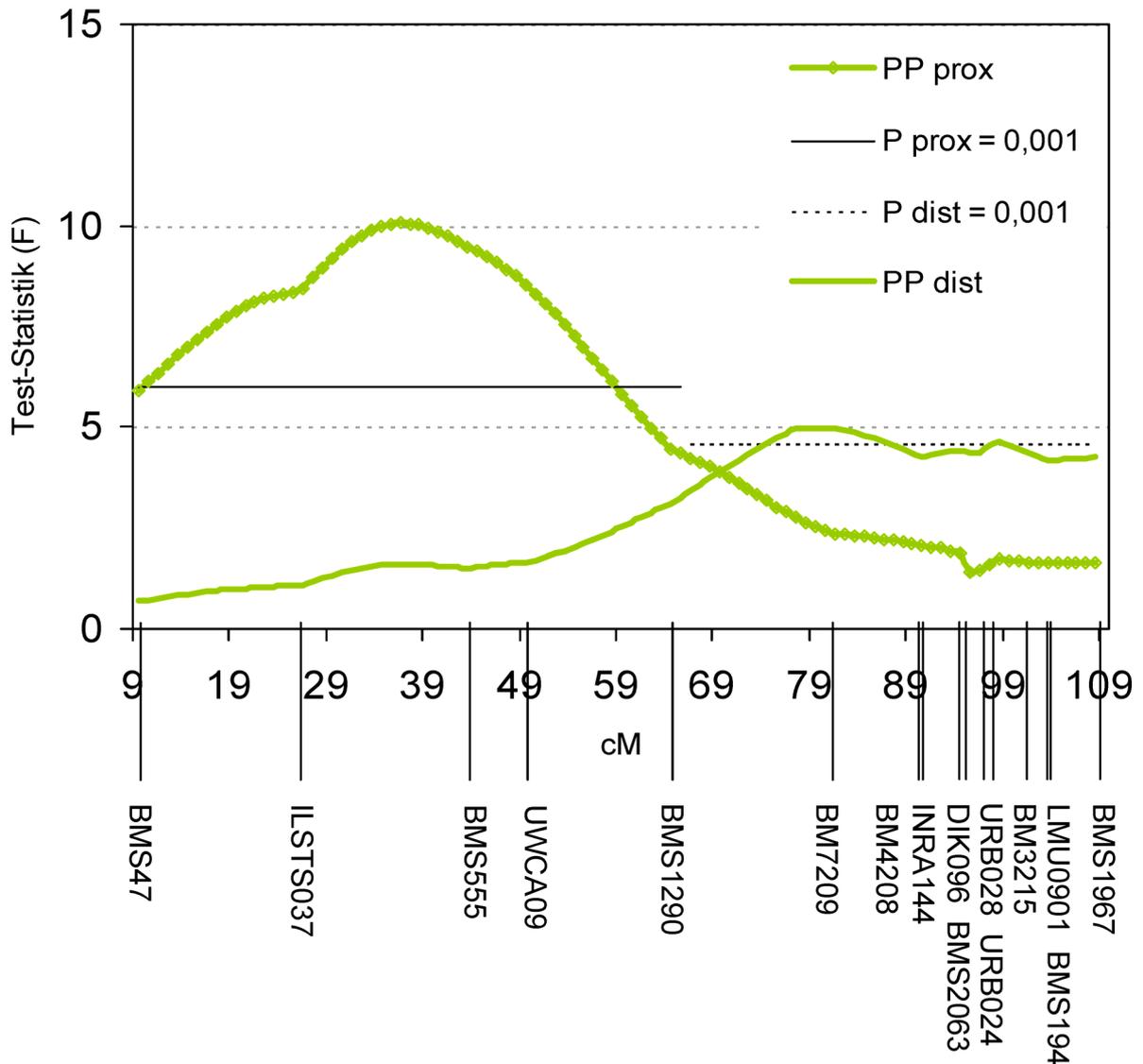


Abbildung 18: Intervallkartierung mit 5 Familien für den proximalen PP-QTL und 4 Familien für den distalen PP-QTL.

4.1.2.2 Auswertungen der „selective DNA pools“

Im Rahmen des genomweiten Scans wurden DNA-Pools für die Merkmale Proteinprozent (PP) und Milchmenge (MY) für 18 Daughter Design-Familien mit 5 Mikrosatellitenmarkern auf BTA09 genotypisiert (s. Tabellen 14 und 15 sowie Abb. 19 und 20). Zwei dieser 18 Familien sind auch als GDD in dieser Studie vertreten (GDD28 und GDD31). Diese beiden Familien ermöglichen einen Vergleich zwischen den Kartierungsergebnissen aus verschiedenen Designs (s. Tabelle 16).

In der Auswertung von SDP mit dem „Approximative Interval Mapping“ (AIM) konnten auf BTA09 in der Fleckviehpopulation ein signifikanter QTL für Proteinprozent bei 40

cM (BMS555) kartiert werden, ein indikativer QTL ist bei 90 cM lokalisiert (s. Abb. 20).

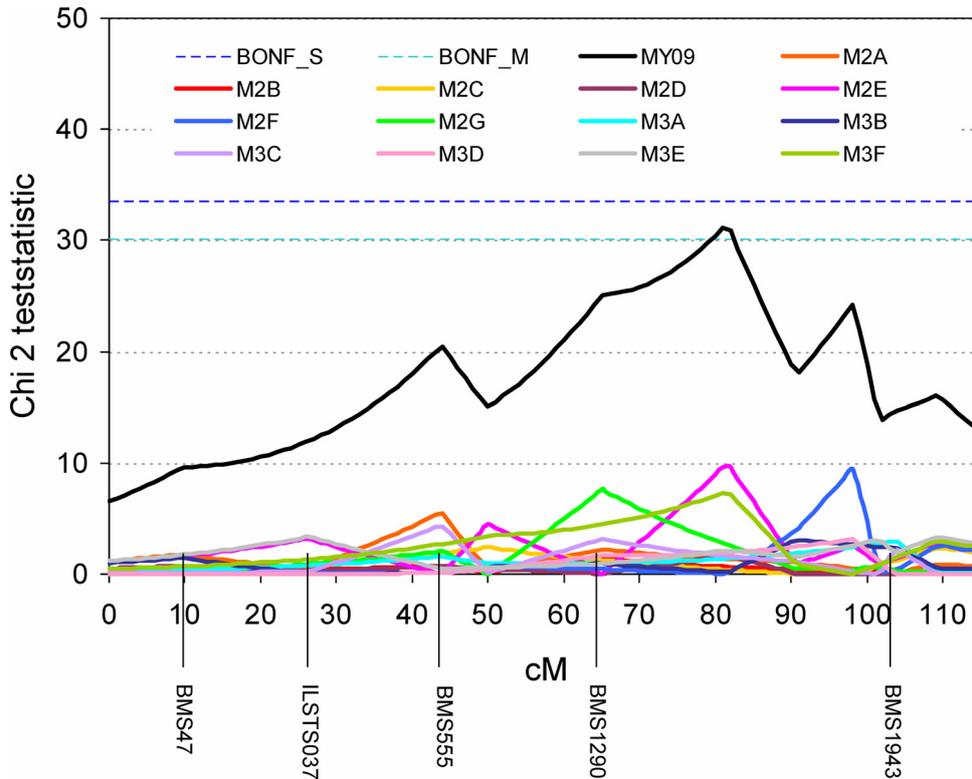


Abbildung 19: Approximative Interval Mapping (AIM) für Milk Yield aller ausgewerteten SDP.

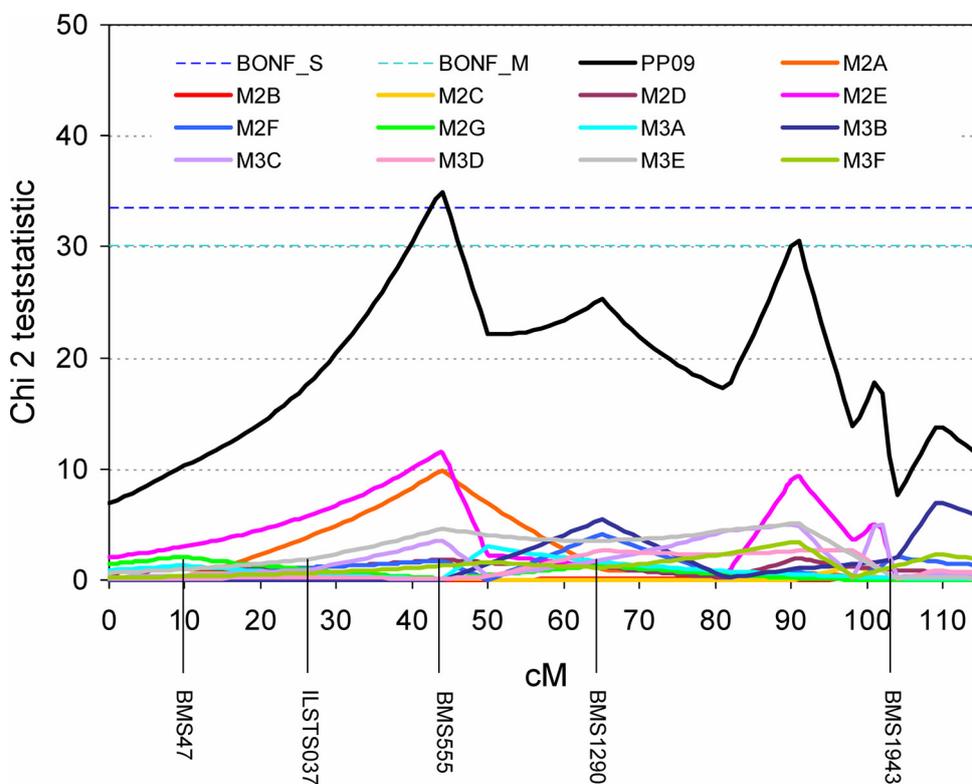


Abbildung 20: Approximative Interval Mapping für Proteinprozent aller ausgewerteten SDP.

Alle Familien beider Ressourcepopulationen wurden, wie oben bereits gezeigt, getrennt ausgewertet. In Tabelle 14 und 15 sind alle signifikanten Familien der SDP aufgeführt.

Tabelle 14: Hochsignifikante Pools in RP2 und RP3 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,01$.

Signifikanz Pools: $ZD > 2,0$; $P < 0,01$				
Familie	ZD	P	Marker	Position (cM)
M2APP	3,15	0,0016	BMS555	43,818
M2BPP	2,76	0,0058	BMS555	43,818
M2BPP	5,21	0,0000	BMS1967	109,287
M2EPP	3,11	0,0019	BM4208	90,690
M2EPP	3,42	0,0006	BMS555	43,818
M3BPP	2,68	0,0073	BMS1967	109,287

Tabelle 15: Signifikante Pools in beiden Ressource-Populationen mit $0,01 < P < 0,05$.

Signifikanz Pools: $ZD > 2,0$; $P < 0,05$, $P > 0,01$				
Familie	ZD	P	Marker	Position (cM)
M2FPP	2,05	0,0403	BMS1290	64,935
M3BPP	2,35	0,0187	BMS1290	64,935
M3CPP	2,12	0,0339	BM7209	81,569
M3CPP	2,26	0,0238	BM4208	90,690
M3EPP	2,12	0,0337	BM7209	81,569
M3EPP	2,16	0,0304	BMS555	43,818
M3EPP	2,28	0,0227	BM4208	90,690

Beim Vergleich der Ergebnisse erster Auswertungen von SDP als DD mit GDD und individuell genotypisierten DD-Familien für das Merkmal Proteinprozent wurden Familien beobachtet, die in mindestens zwei Kartierungsdesigns vertreten waren. Nur in einer Familie (Familie M2E) gab es Übereinstimmungen zwischen SDP und anderen Kartierungsdesigns bei gleicher Haplotypenphase. Alle anderen Familien weisen entweder im einen oder anderen Kartierungsdesign einen signifikanten QTL für Proteinprozent auf (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Vergleich zwischen Ergebnissen aus SDP, GDD und DD (individuelle Genotypen). Signifikante Ergebnisse sind grau unterlegt.

Familie	GDD	SDP		Intervallkartierung (IM)			Kommentar
		<i>P</i> -Wert	Pos. (cM)	F-Statistik	Pos. (cM)	Design	
M2E	/	0,002	90,5	3,9	90,0	DD M2E	übereinstimmendes Ergebnis
M2F	28	0,040	65,0	2,3	104,0	GDD28	SDP signifikant
M2G	29	0,259	65,0	7,8	65,0	DD M2G	IM signifikant
M2B	30	/	/	8,0	85,0	DD M2B	IM signifikant, kein SDP
M3C	31	0,034	81,6	0,2	/	GDD31	SDP signifikant IM max F=0,02, chromosomweit
		0,024	91,7				
		0,015	101,6				

4.1.2.3 Feinkartierung für das Merkmal Proteinprozent

Intervallkartierung für das Merkmal Proteinprozent

Neben der Feinkartierung von paternaler Totgeburt und paternalem Kalbeverlauf wurden zehn Familien für 33 Marker außerdem auf einen möglichen QTL für Proteinprozent mit Intervall- und LDL-Kartierung untersucht. Wie bereits erwähnt, lagen für eine der elf Familien (GDD36, Poldi) noch keine Zuchtwerte für Milchmerkmale vor, da zum Zeitpunkt der Zuchtwertschätzung noch nicht ausreichend viele Enkeltöchter des Bullen in Laktation waren.

Die gemeinsame Analyse der zehn Familien aus 11GDD mit 33 Markern ergab keinen signifikanten QTL für Proteinprozent bei der Auswertung mit der Intervallkartierung (QTLexpress). Bei der familienweisen Auswertung zeigte sich die GDD-Familie 12 (Renner) für einen proximalen ($P < 0,05$, BM2504 – BMS1290) und einen distalen ($P < 0,01$, URB028 – BMS1967) PP-QTL signifikant. Eine Familie (GDD-Familie 23, Horb) zeigt im mittleren Bereich des Chromosoms einen signifikanten QTL ($P < 0,01$). GDD-Familie 09 (Streitl) ist mit $P > 0,05$ nur indikativ für PP, zeigt jedoch eine Tendenz zu einem proximalen QTL.

Da in der Feinkartierung zehn Familien ausgewertet wurden, die ursprünglich für die Merkmale paternale Totgeburt und paternalen Kalbeverlauf ausgewählt worden sind, ist der QTL für Proteinprozent weniger deutlich als in der Reanalyse von 24 Familien aus 2GDDscan (s. Abb. 21).

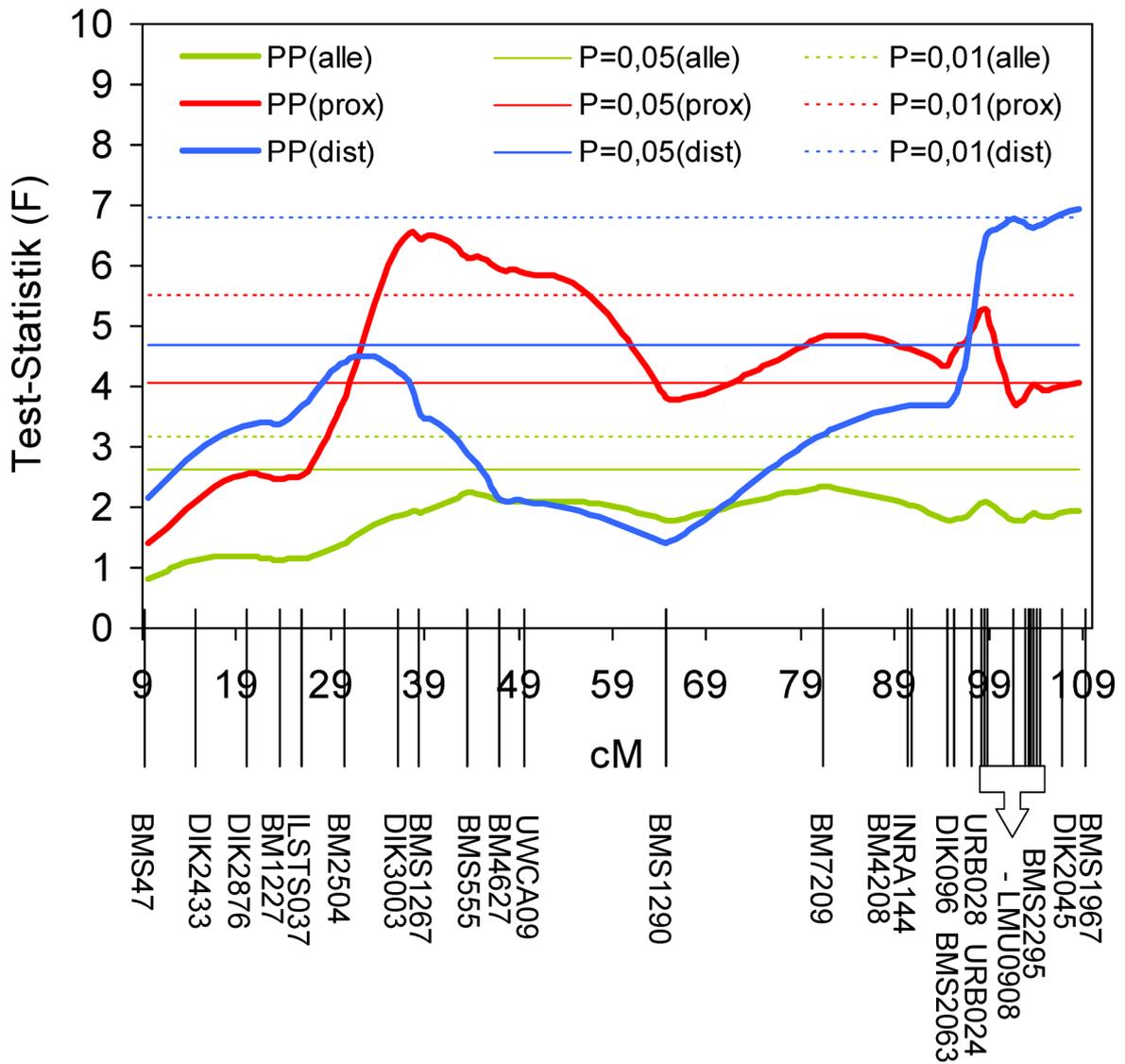


Abbildung 21: Intervallkartierung für Proteinprozent mit 11GDD.

Feinkartierung des Proteinprozent-QTL und durchschnittlichen Haplotypen aus MCMC-Iterationen

Wie bereits für die Merkmale TGp und KVp durchgeführt, wurde auch PP mit dem LDL-Ansatz feinkartiert.

Aus der LDL-Kartierung mit dem Programm LDLrams1.76 (Lee und van der Werf 2004 und 2005) werden die IBD-Wahrscheinlichkeiten mit MCMC geschätzt. Die dabei entstandene „Genotype Relationship Matrix“ (GRM) repräsentiert die durchschnittlichen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Haplotypen entlang einer Iterationskette und kann für die Analyse aller einzelnen Merkmale verwendet werden. Die so entstandene GRM konnte für Proteinprozentzuchtwerte (eBV) und Proteinprozent-Töchterabweichungen (Daughter Yield Deviations, DYDs) mit dem Programm LDL1.42 verwendet werden. Somit ist die zeitaufwendige Berechnung der IBD-Wahrscheinlichkeiten eine einmalige Angelegenheit.

Mit der LDL-Kartierung konnte bei der gemeinsamen Analyse von 10 GDD-Familien aus 11GDD ein signifikanter QTL für Proteinprozent-DYD kartiert werden (PPYD: $P=0,0054$ bei 101,67 cM, Likelihood Ratio 7,7456). Das 1-LOD drop-off confidence interval (berechnet wie bei Lander und Botstein, 1989) liegt bei PPYD zwischen 98,82 und 103,0 cM. Die Feinkartierung mit LDL war für geschätzte Zuchtwerte (PPeBV) mit $P=0,124$ nicht signifikant (s. Abb. 22).

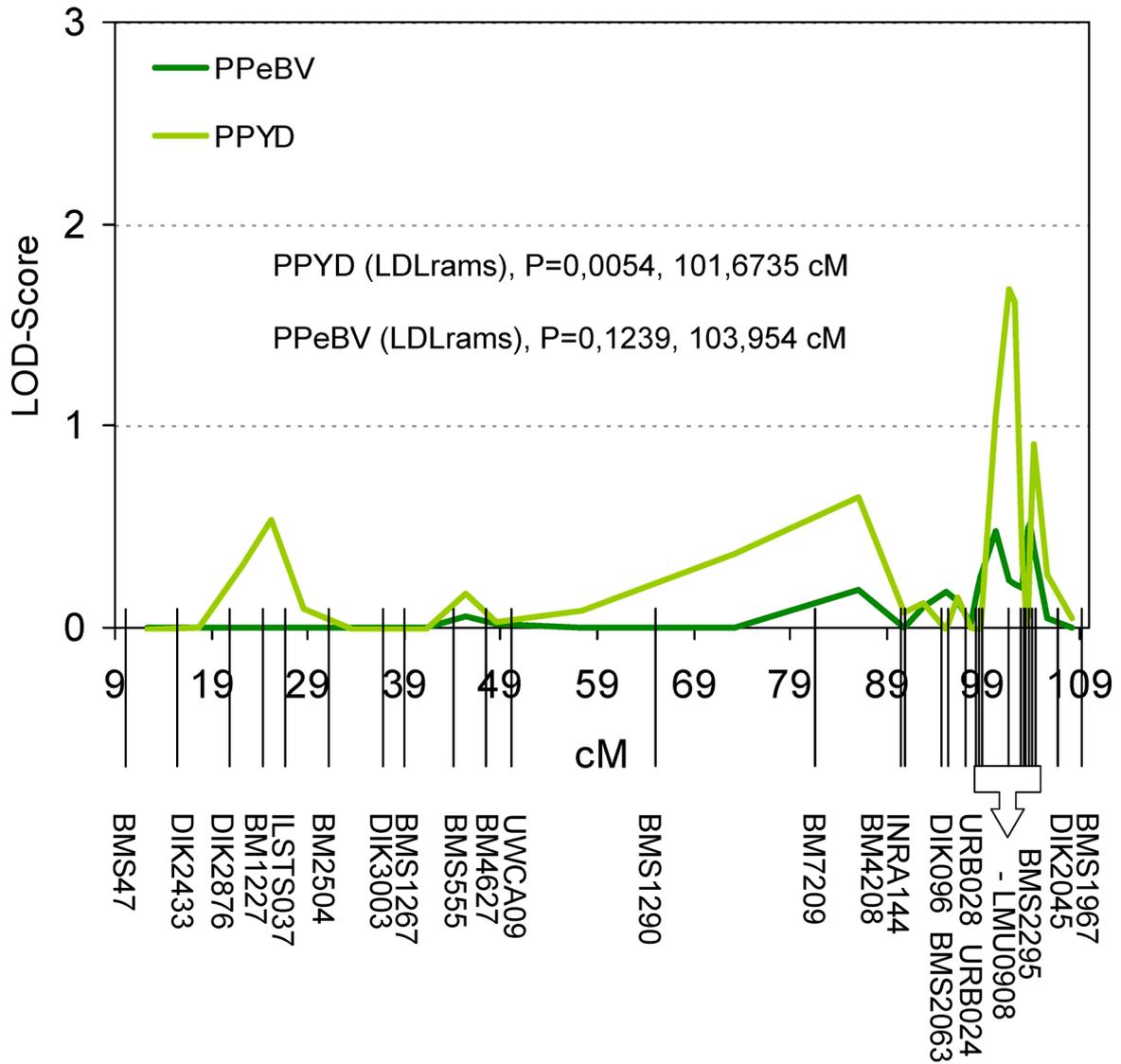


Abbildung 22: Feinkartierung für PP Zuchtwerte und DYDs mit LDLrams1.76. DYDs sind hier mit $P=0,0054$ hochsignifikant.

Feinkartierung mit LDL und wahrscheinlichsten Haplotypen für Proteinprozent

Analysen mit den wahrscheinlichsten Haplotypen, berechnet mit SimWalk2 und anschließender LDL-Kartierung mit dem Programm LDL1.42, ergaben im Vergleich zu Auswertungen mit durchschnittlichen Haplotypen des MCMC-Samplings (LDLrams1.76) eine höhere Likelihood Ratio (LDLrams1.76: LR=7,7456, LDL1.42: LR=9,8408) und dadurch einen höheren *P*-Wert (LDLrams1.76: *P*=0,054, LDL1.42: *P*=0,0017). Das Markerintervall BMS2295 – LMU0908 bei LDLrams1.76 ist im Vergleich sehr viel kleiner als bei LDL1.42 und wahrscheinlichsten Haplotypen (Peak im Bereich 64,935 – 101,647 cM, BMS1290 – BM3215, s. Abb. 23).

Im Vergleich der LR-Kurven aus beiden Analysen (durchschnittliche MCMC-Haplotypen und wahrscheinlichste Haplotypen aus SimWalk2) ergibt sich ein glatterer Kurvenverlauf mit den wahrscheinlichsten Haplotypen (s. Abb. 23: Kurve „Haplo“). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der MCMC-Algorithmus im Programm LDLrams1.76 eine deutlich höhere Anzahl an Samplings für eine vollständige Konvergenz benötigt.

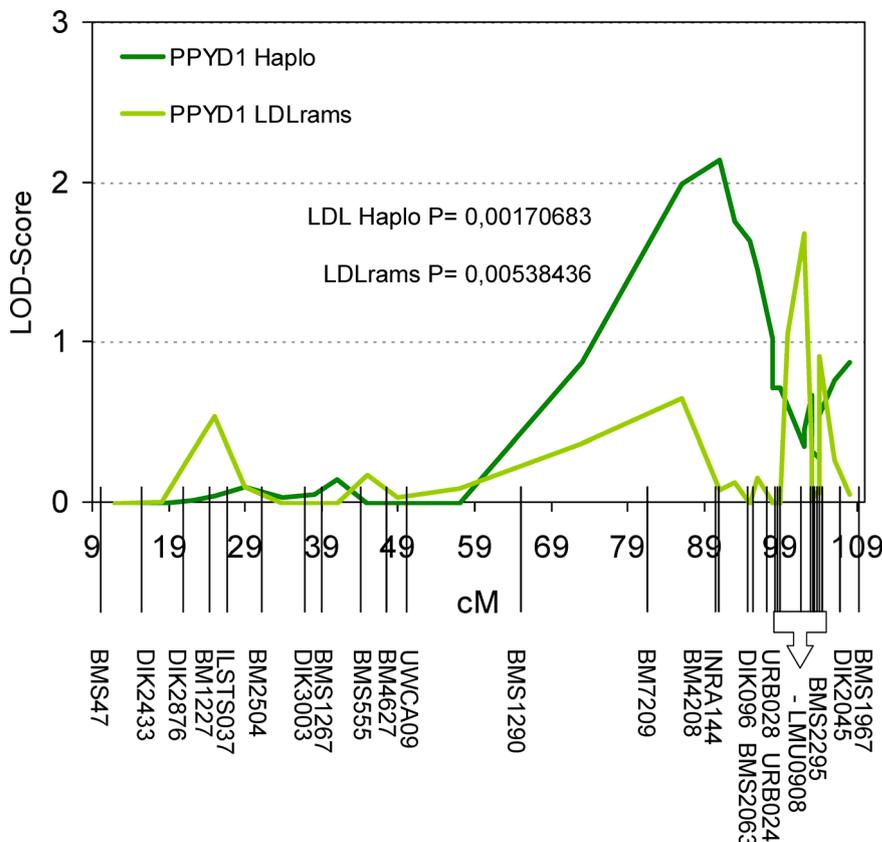


Abbildung 23: Vergleich der LDL-Kartierung mit wahrscheinlichsten Haplotypen (LDL Haplo, SimWalk2) und durchschnittlichen MCMC Haplotypen (LDLrams).

In der Analyse mit den wahrscheinlichsten Haplotypen der PP-Töchterabweichungen (erste drei Laktationen) ergeben sich zwei hochsignifikante QTL: in der ersten Laktation bei 90,835 cM mit $P=0,0017$ und in der dritten Laktation bei 86,1295 cM mit $P=0,0089$. Für die DYD der 2. Laktation und die Analyse mit geschätzten Zuchtwerten (eBV) als Phänotypen ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse (PPYD2: $P=0,216$, PPeBV: $P=0,114$, s. Abb. 24).

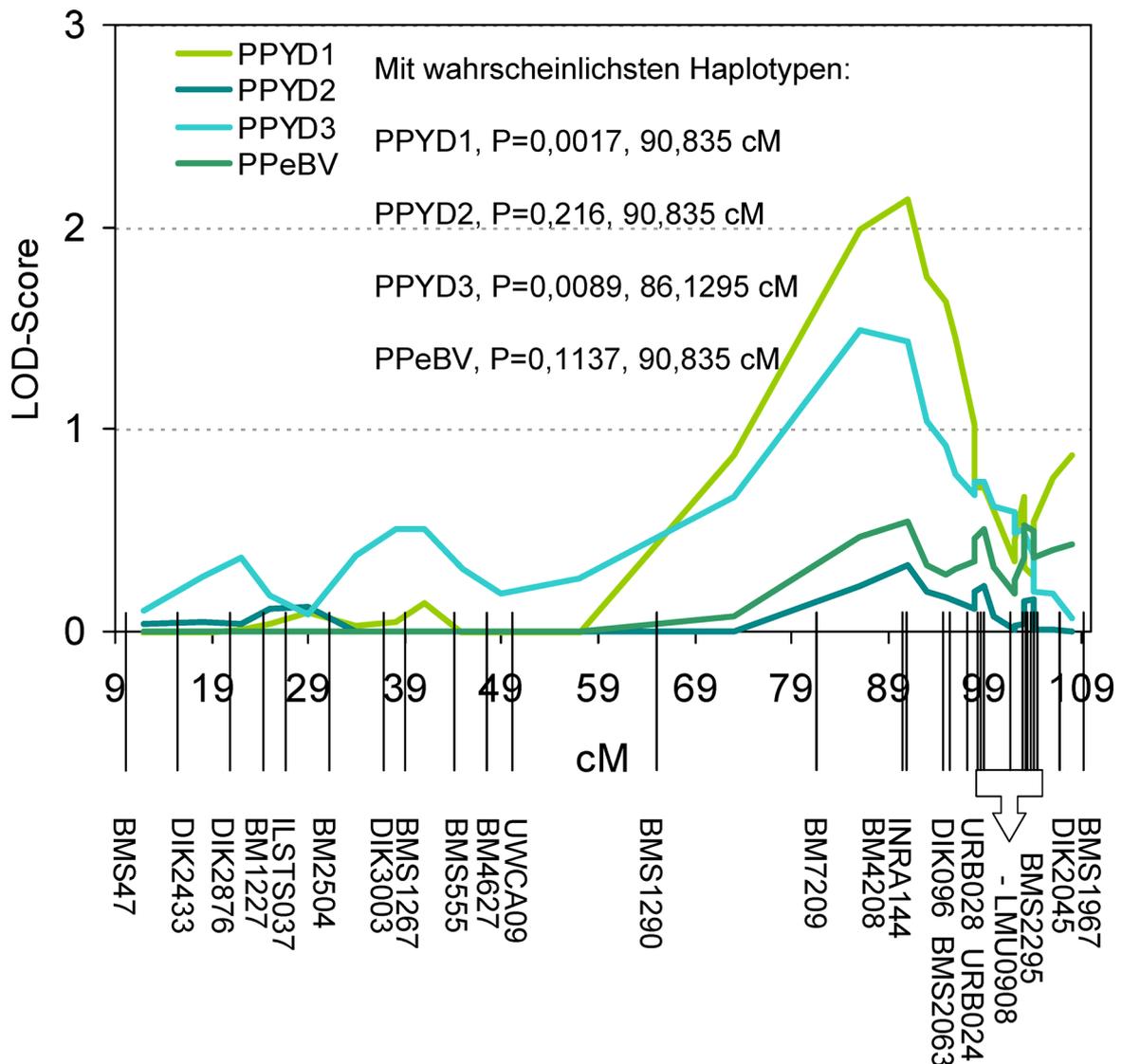


Abbildung 24: Ergebnisse der LDL-Kartierung mit wahrscheinlichsten Haplotypen (SimWalk2) für PPYD1, PPYD2, PPYD3 und PPeBV.

4.1.3 Kandidatengenanalyse

Mögliche positionelle und funktionelle Kandidatengene für paternale Totgeburt und paternalen Kalbeverlauf im distalen Bereich von Chromosom 9 wurden durch online-Recherche ermittelt (hauptsächlich NCBI Map viewer und NCBI Nucleotide wgs contigs: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Die Marker LMU0907 und LMU0906 liegen in den Genen SLC22A3 bzw. IGF2R. Der Marker LMU0901 konnte auf das Exon 48 von IGF2R begrenzt werden (s. Abb. 25). IGF2R wäre ein denkbare positionelles und funktionelles Kandidatengen für paternalen Kalbeverlauf und paternale Totgeburt.

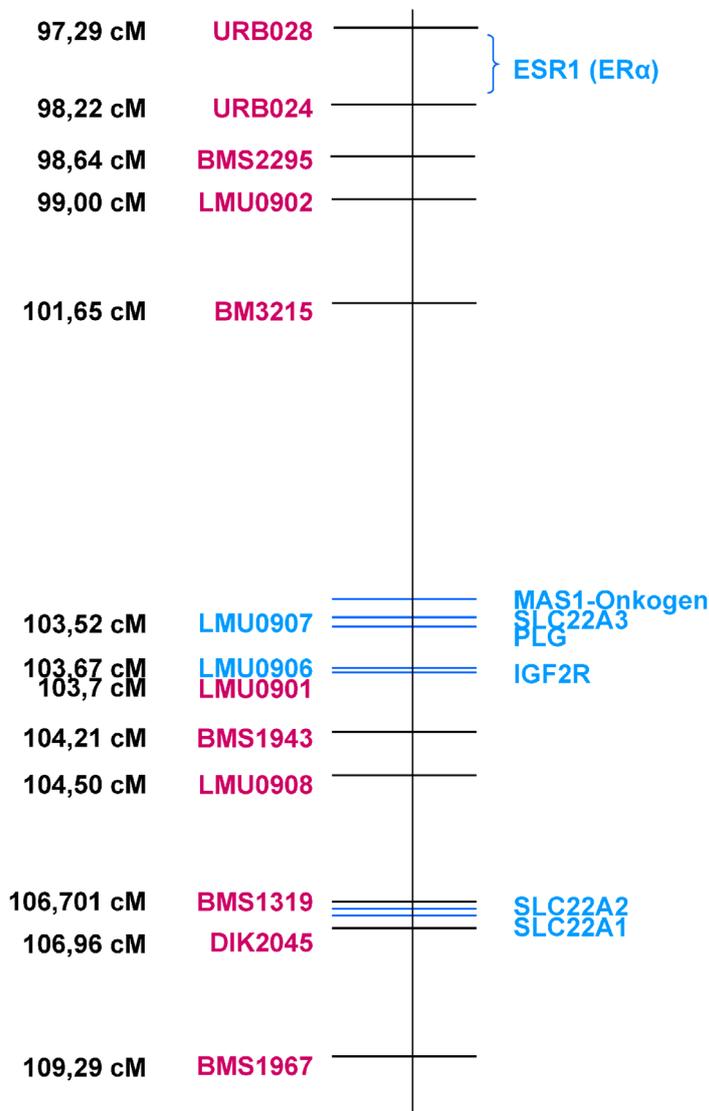


Abbildung 25: Maßstabsgetreue Abbildung der Marker und Gene im distalen Bereich von BTA09. Marker und deren Position sind links, Gene rechts dargestellt.

Für den PP-QTL im distalen Bereich zwischen 90 und 110 cM könnte als positionelles und funktionelles Kandidatengen der Östrogen-Rezeptor 1 (ESR1) in Frage kommen. Dieser ließ sich nach gründlicher Datenbankrecherche mit Hilfe von wgs-contigs und Durchsicht vergleichender Karten (Radiation Hybrid-Karte, Markerkarte des MARC und NCBI-Genkarte) mit dem „NCBI Map Viewer“ genau zwischen die Marker URB028 und URB024 verankern. Somit kann ESR1 auf etwa 1 cM genau zwischen 97,285 und 98,219 cM kartiert werden (s. Tabelle 17). Eine Übersicht über die Position beider Gene auf BTA09 gibt Abb. 26.

Tabelle 17: Marker und Gene im distalen Bereich von BTA09 mit wgs-contigs und Posititon.

Marker, Gen	wgs-contig	cM
URB028	AAFC03060944	97,285
<i>ESR1 (mRNA)</i>	AAFC03025290	
	AAFC03108171	
URB024	AAFC03030120	98,219
BMS2295	AAFC03091063	98,646
LMU0902	AAFC02003161	99,000
BM3215	AAFC02085357	101,647
<i>MAS1</i>	AAFC02165023	
LMU0907, <i>SLC22A3</i>	AAFC02060668	103,520
<i>PLG</i>	AAFC02086215	
<i>IGF2R</i>	AAFC02048204	
LMU0906, <i>IGF2R</i>	AAFC02048204	103,670
LMU0901, <i>IGF2R</i> Exon 48	AAFC02158291	103,700
BMS1943	AAFC02047088	104,208
LMU0908	AAFC02084580	104,500
BMS1319	AAFC02047055	106,701
<i>SLC22A2</i>	AAFC02060665	
<i>SLC22A1</i>	AAFC02060670	
DIK2045	AAFC02013896	106,701
BMS1967	AAFC02075493	109,287



Abbildung 26: Lokalisation von ESR1 und IGF2R auf BTA09, Ausschnitt aus dem NCBI Map Viewer.

4.2 BTA29

Aufgrund des Kandidatengens IGF2R auf BTA09 für die Merkmale TGp und KVp wurde BTA29 als Chromosom, auf dem das Gen für IGF2 lokalisiert ist, ausgewählt. Es erschien plausibel, dass auf BTA29 möglicherweise ebenfalls QTL mit Effekt aus TGp oder KVp kartieren könnten.

Deshalb wurden 10 Familien mit insgesamt 531 Tieren aus 11GDD für ein Set aus 16 Markern genotypisiert. Da die Familie GDD23 erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Analysen auf BTA09 miteinbezogen wurde, als die Kartierungen auf BTA29 bereits abgeschlossen waren, wurde diese Familie nicht für die unten aufgeführten Marker genotypisiert.

4.2.1 Marker

Für 531 Tiere aus 10 GDD-Familien (Familie 23, Horb wurde nicht für Marker auf BTA29 genotypisiert) und 81 Tiere des 6GP wurden 16 Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 29 mit der Multiplex-PCR „fm29“ typisiert. Da es sich hierbei um erste Kartierungen zur Evaluierung möglicher QTL auf BTA29 handelte, war das durchschnittliche Markerintervall mit etwa 5 cM weniger dicht als auf BTA09 (s. Tabelle 18).

Die Marker RM389, MNB127 und DIK4953 lieferten keine, bzw. inkonsistente Genotypen und wurden deshalb von der Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 18: Auf Chromosom 29 genotypisierte und analysierte Mikrosatellitenmarker mit Datenbank-information.

Marker	Multiplex	Position (cM)	Datenbank	Accession No.
1	BM4602	fm29	0,924	GENBANK G18539
2	DIK720	fm29	4,106	keine Angabe
3	ILSTS019	fm29	11,593	GENBANK L23492
4	DIK5376	fm29	16,942	DDBJ AB166361
5	BMC8012	fm29	21,116	GENBANK G18773
6	OARHH22	fm29	41,57	GENBANK L13870
7	BMC3224	fm29	46,673	keine Angabe
8	DIK4901	fm29	56,387	DDBJ AB166012
9	URB011	fm29	59,938	GENBANK U21757
10	BMC6004	fm29	62,255	GENBANK G19099
11	DIK2078	fm29	62,536	DDBJ AB164804
12	BMS1948	fm29	65,64	GENBANK G18711
13	ILSTS081	fm29	69,009	GENBANK L37276

Tabelle 19: Auf BTA29 verwendete Marker mit Primern. Primer 1 ist am 5'-Ende fluoreszenzmarkiert.

Marker	Primer 1 (forward, 5' – 3')	Primer 2 (reverse, 5' – 3')	Label
BM4602	GTGCATTCACACATCTCCATG	AATCTCTTGGGATGATGCCTT	hex
DIK720	GCAGTCCAAGGGACTCTCAA	TACCCTCCAATCCCATGTTG	tet
ILSTS019	AAGGGACCTCATGTAGAAGC	ACTTTTGGACCCTGTAGTGC	hex
DIK5376	CTCTTCCCCACATGCAATTT	TCAGCTGTTTGCTGGTTCAC	tet
BMC8012	AATTCCATGCACAGAGGACC	GATTCCAGAAAGTTCCCCCA	fam
OARHH22	CAACAGGACCTTGAAAACCACACC	CTCAGTTTAATTCCATAGACCAACAGG	hex
BMC3224	CCATCACTGCTATTCTACCTCC	CACAGCCAATTTCTGATTTTCAG	tet
DIK4901	CGTGAGCTCTAGGAGGCACT	TCAATCTCTGGGTGGGAAG	hex
URB011	AGCAGGAGCTCAGGCTCA	GAGAAGCTTGGAATGTGCAG	tet
BMC6004	ACCTGTGCCTTTTGCTTGTC	GCTGGTGGTGAGATGAGGAT	fam
DIK2078	GATGCGATCAGATTCTTGCT	AGTGTTCCCCTGTCTGGTTC	fam
BMS1948	AACACAGGGAAGTGTGTTTTTAA	GACAGTTTGTGGTGTGGAGAC	fam
ILSTS081	AGTCAGACAACGACTGTGCG	TTTCGAACAGGCTTTTGGGG	tet

4.2.2 Intervallkartierung auf BTA29

Eine Intervallkartierung mit QTLexpress wurde für neun der zehn genotypisierten Familien für Milch- und Fitnesszuchtwerte (paternale und maternale Fruchtbarkeit FE_p und FE_m), paternalen und maternalen Kalbeverlauf, paternale und maternale Totgeburt sowie den Zuchtwert für Fleisch (FW) durchgeführt (s. Abb. 25 und 26). Die GDD-Familie 36, „Poldi“ floss aufgrund noch nicht vorhandener Zuchtwerte für Milch- und Fitnessmerkmale nicht in die Auswertung mit ein, GDD23 „Horb“ wurden nicht für Marker auf BTA29 genotypisiert.

Das Ergebnis der Intervallkartierung in den 10 Familien weist auf einen QTL für Fettprozent zwischen 10 und 20 cM (ILSTS019 – BMC8012) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ hin. Die Test-Statistik-Werte anderer Milchzuchtwerte deuten auf keinen weiteren signifikanten QTL hin.

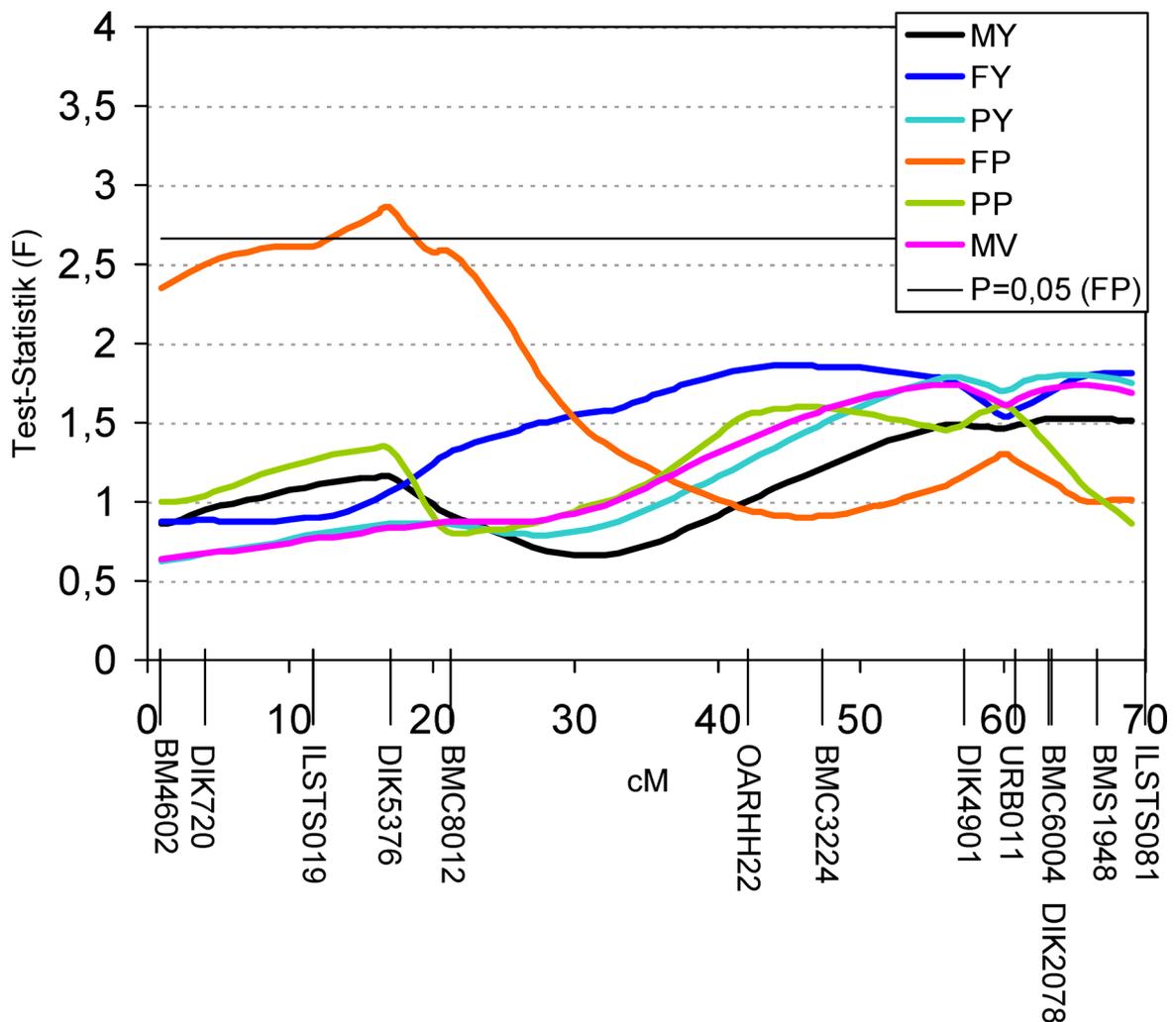


Abbildung 27: Intervallkartierung für 9 Familien auf BTA29, Milchzuchtwerte.

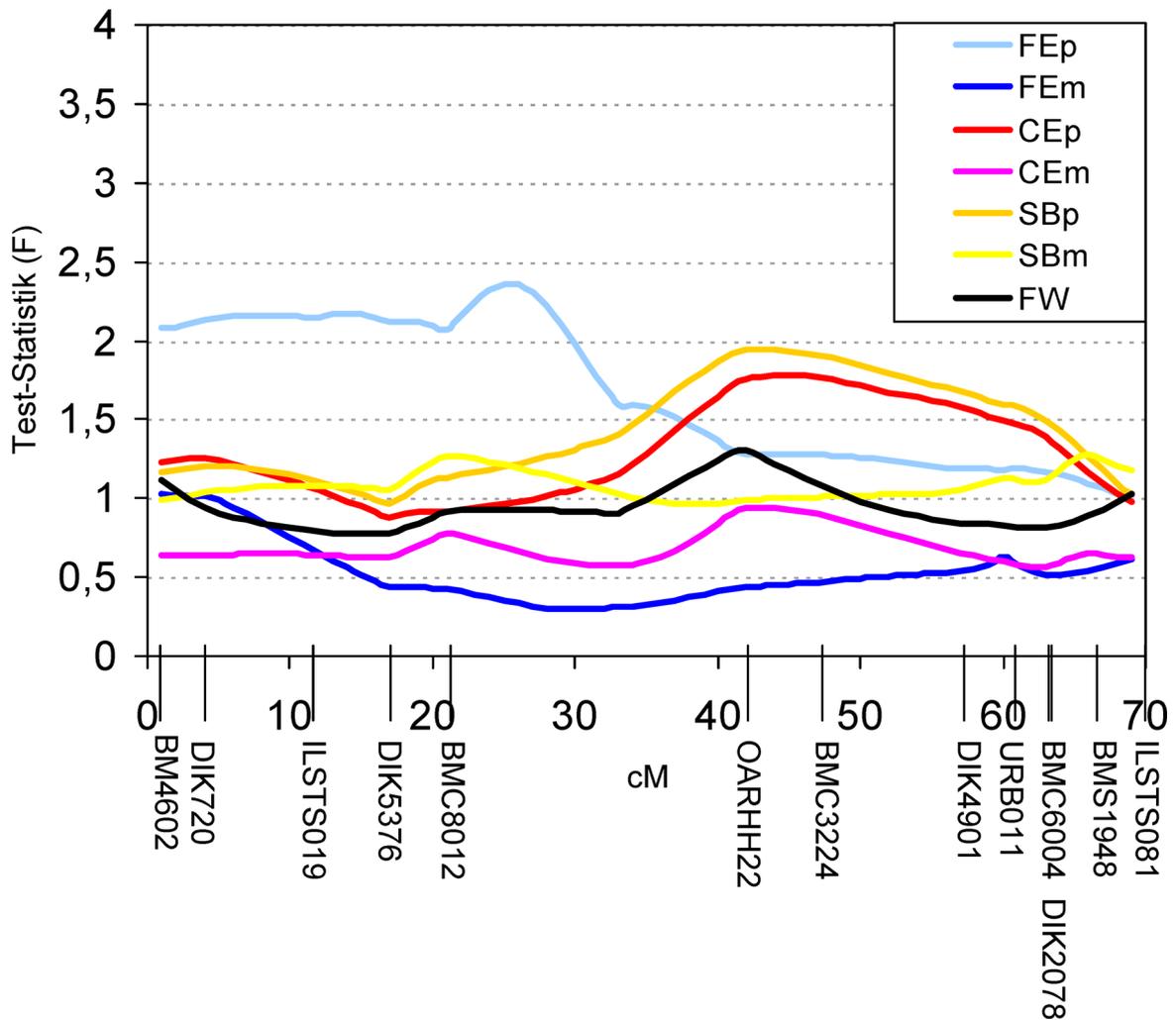


Abbildung 28: Intervallkartierung für 10 Familien: Zuchtwerte für Fitness-Merkmale und Fleisch.

Die Betrachtung einzelner Familien, wie schon für KVp und TGp sowie PP auf BTA09 durchgeführt, und die Analyse aller Familien gaben keinen Hinweis auf einen signifikanten QTL für Totgeburt oder Kalbeverlauf auf Chromosom 29. Daher wurden keine weiteren Marker auf BTA29 ausgewählt und genotypisiert. Außerdem wurde bis jetzt keine LDL-Kartierung auf diesem Chromosom durchgeführt.

5 Diskussion

5.1 BTA09

5.1.1 QTL für die Merkmale Totgeburt und Kalbeverlauf paternal

Auswertungen mit der Intervallkartierung ergaben bei Reanalysen in 7 Familien einen proximalen QTL für KVp und TGp zwischen 9,65 cM und 64,935 cM mit den höchsten Test-Statistikwerten zwischen 26,26 cM und 43,818 cM (s. Abb. 5). Die Feinkartierung mit einer Gruppe aus 4 Familien mit Zuchtwerten aus dem Achtmerkmalsmodell engte den QTL auf das Markerintervall BMS47 – BMS555 ein (9,653 – 43,818 cM, Abb. 10). Analysen mit dem Einmerkmalsmodell in der Intervallkartierung zeigten hochsignifikante Ergebnisse zwischen DIK2876 und BMS1267 für KVp2 und signifikante Ergebnisse zwischen BMS47 und DIK2876 für TGp und TGp2 (s. Abb. 12 und 13). Außerdem konnte ein kleiner Peak mit LDLrams (Achtmerkmalsmodell, durchschnittliche Haplotypen) für KVp zwischen ungefähr 30 und 50 cM lokalisiert werden (Abb. 14). Dieser deutet evtl. auf einen zweiten QTL wie bei der Intervallkartierung hin. KVp ist mit dem Achtmerkmalsmodell und der Analyse mit den wahrscheinlichsten Haplotypen (LDL1.42) mit $P=0,026$ signifikant bei 17,768 cM (DIK2433 – DIK2876) und KVp2 (Einmerkmalsmodell) bei ebenfalls 17,768 cM signifikant mit $P=0,003$ (s. Abb. 15).

Im distalen Bereich des Chromosoms zwischen 94,8 und 109,3 cM wurde in ersten Reanalysen bei 8 Familien der QTL für TGp und KVp entdeckt (Intervallkartierung, Achtmerkmalsmodell, s. Abb. 6). In der Intervallkartierung mit 5 Familien (Achtmerkmalsmodell, s. Abb. 11) und 3 Familien im Einmerkmalsmodell (s. Abb. 12 und 13) befand sich der QTL zwischen URB028 und BMS1967 (97,285 – 109,287 cM). Die LDL-Kartierung mit LDLrams (Achtmerkmalsmodell, durchschnittliche Haplotypen) ergab einen sehr scharfen Peak für KVp zwischen LMU0906 und LMU0901 (103,67 und 103,7 cM) und kein signifikantes Ergebnis für TGp (s. Abb. 14). Auswertungen mit LDL1.42 (wahrscheinlichste Haplotypen) ergeben für KVp und KVp1 signifikante QTL im Einmerkmalsmodell (KVp: 103,685 cM, $P=0,04$; KVp1: 103,59 cM, $P=0,03$; LMU0907 – LMU0901) und für TGp1 einen signifikanten QTL mit $P=0,029$ bei 90,835 cM (BM4208 – INRA144) (s. Abb. 15 und 16).

QTL-Kartierungen verschiedener Autoren für Kalbeverlauf, Totgeburt und andere Merkmale ergaben wenige Hinweise für QTL auf BTA09, KVp und TGp betreffend.

Schrooten et al., 2000 entdeckten signifikante QTL für paternalen Kalbeverlauf auf BTA05 (166 cM), BTA06 (44 cM) und BTA21 (33 cM) sowie zwei QTL für Geburtsgewicht auf BTA05 (132 cM) und BTA29 (29 cM). Der QTL für paternalen Kalbeverlauf und Größe auf BTA06 entspricht den Ergebnissen von Kühn et al., 2003. Auf BTA09 wurde von Schrooten et al., 2000 lediglich ein QTL für die NR56 (Nonreturn-Rate 56 Tage post inseminationem) gefunden.

Van Tassell et al., 2000 kartierten auf BTA09 einen QTL für die Beckenwinkelung bei 59 cM.

Kühn et al., 2003 beschrieben QTL mit Effekt auf paternale Dystokie und paternale Totgeburt auf BTA06 (44 cM) und BTA10, sowie mögliche QTL für paternale Dystokie und Totgeburt auf BTA07 und BTA13 bei Deutschen Holstein-Friesian, fanden jedoch keinen QTL für Kalbeverlaufsmerkmale auf BTA09.

Hiendleder et al., 2003 kartierten auf BTA09 einen QTL für Sprunggelenkwinkelung bei 59 cM ($P=0,048$).

Ein genomweiter Scan von Schrooten et al., 2004 zum Nachweis chromosomaler Regionen, welche mehrere Merkmale beinhalten, erbrachte lediglich die Merkmale „Zentralband“ und NR56 auf BTA09, wie bereits von Schrooten et al., 2000 beschrieben wurde.

QTL-Kartierungen für Amerikanische HF von Ashwell et al., 2005 wiesen auf 4 QTL auf BTA09 hin: Kalbeverlauf in Prozent Schweregeburten bei 96 cM, Steißwinkel bzw. Beckenwinkelung bei 58 cM in Übereinstimmung mit Van Tassell et al., 2000, Sprunggelenkwinkelung der Hinterbeine bei 61 cM, was mit Hiendleder et al., 2003 übereinstimmt, sowie „Stärke“ bei 64 cM. Die F-Statistik-Werte auf BTA09 waren bis auf die Beckenwinkelung nicht signifikant, sondern waren nur hinweisend auf einen QTL. Ashwell et al., 2005 kartierten Kalbeverlauf in Prozent Schweregeburten außerdem auf BTA17 (69 cM), BTA23 (62 cM), BTA24 (22 cM) und BTA27 (36 cM).

Beim genomweiten Scan von Schnabel et al., 2005b fand sich wie bei Ashwell et al., 2005 und Van Tassell et al., 2000 ein QTL für die Beckenwinkelung, jedoch bei 109 cM im distalen Bereich des Chromosoms. QTL für Kalbeverlauf wurden auf 5 Chromosomen gefunden: BTA02, 06, 10, 16 und 26, wobei der QTL auf BTA06 bei 113 cM von Schrooten et al. 2000 und Kühn et al. 2003 auf 44 cM kartiert wurde und Schrooten et al., 2005 auf BTA10 einen QTL für Sprunggelenkwinkelung fand.

Es wurden viele QTL für paternalen Kalbeverlauf kartiert, jedoch wurde bisher nur ein indikativer QTL für paternalen Kalbeverlauf auf BTA09 von Ashwell et al., 2005 beschrieben. Ein möglicher QTL, der mit einem erschwerten Geburtsverlauf einhergehen könnte, ist der QTL für „rump angle“, also Becken- bzw. Steißbeinwinkelung. Falls ein Bulle eine extreme Beckenwinkelung an seine Nachkommen vererbt, könnte dies einen Grund für einen direkten erschwerten Kalbeverlauf, vor allem bei Geburten in Hinterendlage, als auch für maternalen Kalbeverlauf durch eine ungünstige Beckenform darstellen (Hansen et al., 2004a). Mit der Position des QTL bei 59 cM (Ashwell et al., 2005; Van Tassell et al., 2004) und 109 cM (Schnabel et al., 2005b) könnte eine Verbindung zwischen den QTL für Beckenwinkelung und paternalem Kalbeverlauf bzw. paternaler Totgeburt sowohl proximal als auch distal bestehen.

Außerdem wäre ein erschwerter Geburtsverlauf durch eine außergewöhnliche Sprunggelenkwinkelung (BTA09: 61 cM bei Ashwell et al., 2005 und 59 cM bei Hiendleder et al., 2003) des Kalbes denkbar, wie schon Kühn et al., 2003 für paternale Totgeburt und Sprunggelenkwinkelung auf BTA10 vermuteten. Abweichende cM-Angaben hängen immer mit dem jeweiligen verwendeten Kartierungsdesign und Markerdichte zusammen, wodurch die Genauigkeit von Kartierung zu Kartierung erheblich variieren kann (Meuwissen und Goddard, 2000).

5.1.1.1 Auswertungen der LDL-Kartierung für KVp und TGp

Bei der Intervallkartierung verliefen die Kurven für beide Merkmale im Gegensatz zu den Analysen mit LDL fast parallel. Mehrheitlich ergaben die Auswertungen von KVp signifikantere Ergebnisse. Zusammen mit den Ergebnissen der LDL-Kartierung bedeutet das, dass es sich um einen primären Effekt für paternalen Kalbeverlauf mit epistatischen Auswirkungen auf paternale Totgeburt zu handeln scheint. Im Einklang dazu ist die Tatsache, dass nicht jedes Kalb aus einer Schweregeburt stirbt.

Auswertungen mit dem LDL-Ansatz scheinen vor allem für TGp problematisch zu sein. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse ist die Tatsache, dass alle 11 Familien innerhalb eines komplexen Pedigrees gemeinsam analysiert wurden, und nicht nach signifikanten oder indikativen Familien getrennt ausgewertet wurde. Bei der Analyse mit LDLrams1.76 und durchschnittlichen Haplotypen für KVp schien diese Tatsache jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sich ein

signifikanter QTL ergibt. Auf allgemeine Besonderheiten bei der LDL-Kartierung wird später und bei der QTL-Kartierung für Proteinprozent eingegangen.

5.1.2 IGF2R als mögliches Kandidatengen für KVp und TGp auf BTA09

Da nur 3 Familien einen signifikanten bzw. indikativen QTL in der proximalen Region von BTA09 für KVp und TGp auf BTA09 aufweisen, von denen nur die Familie GDD31 hochsignifikant ist, wurde schon von Beginn an die Region am Ende des Chromosoms besser untersucht. Fünf GDD-Familien sind in dieser Region signifikant oder indikativ für einen möglichen QTL mit Effekt auf KVp und TGp (s. Tabelle 12). Daher wurde die Suche nach Kandidatengenen in dieser distalen Region des Chromosoms verstärkt.

Als ein mögliches positionelles und funktionelles Kandidatengen für KVp und TGp stellte sich IGF2R heraus. Dabei handelt es sich um den *insuline-like growth factor 2 receptor* oder *mannose 6-phosphate receptor* auf BTA09, 9q27-q28. Der Rezeptor ist an fetalem Größenwachstum und Organogenese, Tumorsuppression und T-zellulärer Immunität beteiligt (Killian und Jirtle, 1999; Killian et al., 2001).

IGF2R wird mit Störungen im fetalen Größenwachstum bei Schafen und Rindern aus in-vitro- und Klonierungstechniken in Zusammenhang gebracht, woraus das „Large Offspring Syndrome“ (LOS) resultieren kann (Young et al., 1998; Young et al., 2001; Young et al., 2003).

5.1.2.1 Parentales Imprinting bei IGF2R

IGF2R als Rezeptor für das Wachstumshormon IGF2 weist parentales Imprinting auf. Imprinting als epigenetische Modifikation bestimmter Gene hat eine allelspezifische Expression zur Folge. Als epigenetischer Mechanismus des Imprintings findet eine Methylierung der DNA an so genannten CpG-Inseln statt (Moore und Reik, 1996; Moore, 2001; Reik und Walter, 2001). Im Falle des bovinen IGF2R wird von paternalem Imprinting gesprochen, d. h. das exprimierte Allel im fetalen Gewebe ist maternalen Ursprungs (Killian et al., 2001).

Bei übergroßen Feten aus Kerntransfer-Techniken konnte eine Reduktion des Methylierungsgrads und der Expression des IGF2R-Gens von 30 – 60% in fetalem Plasma, Leber und Muskulatur beobachtet werden (Lazzari et al., 2002; Young et al.,

2001). Young et al., 2003 weisen darauf hin, dass Prozeduren und Manipulationen für das Klonen somatischer Zellen die DNA-Methylierung am IGF2R-Lokus stören.

Maternal exprimierte Gene unterdrücken das fetale Wachstum, wobei paternal exprimierte Gene das Wachstum verstärken (Reik und Walter, 2001). Die Beobachtungen bei LOS-Kälbern und Schafen mit einer reduzierten Methylierung von IGF2R deutet auf eine Störung des paternalen Imprinting hin, was ein verstärktes Wachstum durch biallele Expression bewirken könnte. Aber auch Hypermethylierungen der fetalen DNA haben LOS-Phänotypen zur Folge (Hiendleder et al., 2004). Deregulationen im Imprintingmechanismus und abweichende Methylierungsmuster scheinen deshalb generell einen großen Einfluss auf das fetale Größenwachstum zu haben. Allgemein ist zu sagen, dass dem LOS aufgrund Kerntransfer-Techniken systematische Umwelteffekte (Manipulationen, bestimmte Medien, Young et al., 2003) zugrunde liegen.

Gestörte Methylierungsmuster fetaler DNA in den Kontrollgruppen aus künstlicher Besamung (KB) wurden bei Hiendleder et al., 2004 und Cezar et al., 2003 nicht beobachtet. Es konnten keine Unterschiede im Methylierungsgrad der DNA bei erwachsenen Klonen und normalen Tieren aus KB, sowie Feten aus IVF und KB beobachtet werden (Cezar et al., 2003).

Greve und Callesen, 2005 weisen jedoch daraufhin, dass epigenetische Besonderheiten und Abweichungen von der Norm nicht nur unter künstlichen, sondern auch unter natürlichen Bedingungen zur embryonalen und fetalen Sterblichkeit beim Rind führen und darin eine große Rolle spielen. Ähnliche Mechanismen würden deshalb auch unter normalen Bedingungen auftreten und könnten eine Erklärung für fetale Kälbersterblichkeit liefern.

Die epigenetischen Besonderheiten des IGF2R komplizieren die Rückschlüsse auf einen möglichen Zusammenhang zwischen IGF2R mit paternalem Kalbeverlauf und paternaler Totgeburt auf BTA09. Außerdem fließen keine Abkalbungen aus IVF oder ET, welche nur etwa 0,4% aller Abkalbungen darstellen, in die Zuchtwertschätzung ein. Bisher wurde keine Aussage gemacht, dass fetale Deregulationen bei IGF2R auch bei Tieren aus künstlicher Besamung (KB) auftreten. Die unterschiedlichen beobachteten Phänotypen bei Kalbeverlauf und Totgeburt sind demzufolge kein systematischer Umwelteffekt der KB, sondern genetischer Natur. Ein systematischer Umwelteffekt der KB würde sich außerdem kaum in unterschiedlichen Phänotypen bei Nachwuchs aus Besamungsbullen bemerkbar machen.

Wie bei Wutz et al., 1997 beschrieben, ist eine CpG-Insel im zweiten Intron von IGF2R das Signal zum Imprinting („region 2“). Diese Signalsequenz liegt in unmittelbarer Nähe des codierenden Gens. Eine Deletion dieser Region in yeast artificial chromosomes (YACs) führte zu einem Ausfall des Imprinting und verursachte eine biallele Expression von IGF2R.

Möglich wäre eine Mutation, Deletion oder Insertion in diesem Bereich, was die Erkennung als „region 2“ stören könnte und so einen Ausfall oder Störung des Imprintingmechanismus von IGF2R verursachen würde. Inkomplettes paternales Imprinting, bzw. eine biallele Expression von IGF2R könnte somit möglicherweise ein verstärktes embryonales und fetales Größenwachstum verursachen.

Unsere Arbeitshypothese ist, dass Familienväter mit signifikantem Effekt auf KVp bzw. TGp heterozygot für eine mögliche Mutation in dieser region 2 sein könnten. Feten, die einen Haplotyp mit mutierter Imprintingsignalsequenz von IGF2R aufweisen, könnten ein verstärktes fetales Wachstum zeigen, kämen als vergleichsweise große Kälber zur Welt und hätten so eine durchschnittlich höhere Schwer- und Totgeburtenrate als Tiere ohne Mutation des Signals für Imprinting.

Da IGF2R im maternalen Gamet nicht imprintiert, sondern exprimiert wird, impliziert diese Arbeitshypothese indirekt, dass die gleiche Mutation - vererbt über den maternalen Gameten - wirkungslos bleiben würde. Die Sequenzierung der nach unserer Hypothese vermutlich betroffenen Region wird demnächst von uns durchgeführt.

Diese These hätte einen wesentlichen Einfluss auf die Feinkartierung mit dem LDL-Ansatz. Die Intervallkartierung nutzt nur die Kopplungsinformation innerhalb der Halbgeschwistergruppen und nur die Rekombinationen in paternalen Gameten. Der LDL-Ansatz nutzt neben der Kopplung auch das Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium), das heißt, historische Rekombinationen. In unserem Kartierungsdesign des 11GDD in einem komplexen Pedigree kommt die LD-Information hauptsächlich über die maternalen Gameten. Da nur paternale Gameten von einem unterschiedlichen Imprintingstatus betroffen wären, brächten maternale Gameten keine zusätzliche Variabilität des fetalen Wachstums mit sich. Der LDL-Ansatz brächte demzufolge keine Vorteile in der Kartierung und könnte möglicherweise sogar von Nachteil für die Kartierung des QTL sein.

Der LDL-Ansatz kartiert den QTL in das höchstwahrscheinliche Markerintervall in unmittelbarer Nachbarschaft von IGF2R (Marker LMU0901 und LMU0906 sind in

IGF2R lokalisiert, s. Abb.14 und Abb. 25). Trotz der sehr dichten Markerkarte in diesem Bereich ergibt sich im Vergleich zur reinen Kopplungsanalyse keine höhere Signifikanz. Das bedeutet indirekt, dass keine zusätzliche Information durch Kopplungsungleichgewicht erlangt wird.

IGF2R als Rezeptor eines Wachstumsfaktors bleibt ein hochinteressantes Kandidatengen für KVp und TGp, fraglich ist nur das Vorkommen epigenetischer Besonderheiten bei Tieren aus konventioneller KB mit einem möglichen übermäßigen Größenwachstum bis zum Zeitpunkt der Geburt. Bisher können dazu jedoch keine experimentellen Aussagen gemacht werden.

5.1.3 QTL mit Effekt auf das Merkmal Proteinprozent auf BTA09

QTL für Proteinprozent (PP) wurden bisher einmal auf BTA09 beobachtet. Mosig et al., 2001 beschreiben einen QTL mit Effekt auf PP auf BTA09 bei 45 cM (UWCA09) mit $P=0,033$ in einem DD mit selektivem DNA-Pooling der Rasse Israeli Holstein und einen weiteren QTL bei 84 cM (BM4208) mit $P<0,01$. Somit entdeckten Mosig et al., 2001 zwei segregierende QTL für PP auf BTA09.

Plante et al., 2001 beobachteten unter anderem einen QTL mit Effekt auf Milchmenge mit einer resultierenden Tendenz zu einem QTL für PP auf BTA09 zwischen 40 und 60 cM bei zwei Familien.

Die Ergebnisse aus der Intervallkartierung lassen ebenfalls auf zwei QTL schließen, einem proximalen im Markerintervall BM2504 – BMS1290 (30 – 65 cM) und einem distalen im Markerintervall URB028 – BMS1967 (100 – 110 cM). Auch die Analyse der selektiven DNA-Pools durch das AIM-Verfahren deutet beim Fleckvieh auf zwei QTL mit Maxima bei 44 cM (BMS1267 – BMS555) und 91 cM (BM4208) hin.

Viele Autoren untersuchten in verschiedenen Kartierungsdesigns QTL mit Effekt auf wichtige, da ökonomisch interessante, Milchleistungsmerkmale. Vor allem auf BTA06 und BTA20 wurden von mehreren Autoren QTL mit starken Effekten auf PP kartiert (Khatkar et al., 2004). Als Kandidatengen für PP auf BTA06 wurde von Schnabel et al., 2005a das Osteopontin-Gen als funktionelles Kandidatengen beschrieben, auf BTA20 ist der growth-hormone receptor (GHR) ein starkes Kandidatengen für PP (Blott et al., 2003). Mögliche Kandidatengene für PP auf BTA09 werden in Kapitel 5.1.4 diskutiert.

5.1.3.1 Ergebnisse der LDL-Kartierung bei PP

Ergebnisse der Feinkartierung mit dem LDL-Ansatz bei 11 GDD-Familien in einem komplexen Pedigree ergeben nur einen signifikanten QTL im distalen Bereich des Chromosoms. Jedoch besteht ein Unterschied, ob der QTL mit durchschnittlichen Haplotypen (LDLrams1.76) oder mit den wahrscheinlichsten Haplotypen aus SimWalk2 (LDL1.42) kartiert wurde. Die Kartierung mit LDLrams1.76 und PPYD ergibt einen schärferen Peak mit einem definierbaren Vertrauensintervall (1-LOD drop off Intervall von 98,82 – 103,0 cM, LMU0902 – LMU0904) von weniger als 5 cM. Bei der Analyse mit LDL1.42 und wahrscheinlichsten Haplotypen ist der Peak sehr viel weiter und das 1-LOD drop off Intervall kaum zu bestimmen. Das Maximum ist mit 86,13 bzw. 90,84 cM weiter im proximalen Bereich lokalisiert. Bei keinem der beiden LDL-Ansätze kann ein signifikanter QTL im proximalen Bereich kartiert werden. Ein Grund hierfür ist die Auswahl des 11GDD für die Kartierung des QTL mit Effekt auf KVp und TGp. Durch diese Auswahl wurden indirekt auch Familien mit einem distalen QTL mit Effekt auf PP bevorzugt.

Der doppelte Peak von PPYD mit LDLrams1.76 stammt möglicherweise durch zu wenige Samplings (5500) bei einer sehr großen Anzahl von Tieren und Markern (1253 Tiere und 33 Marker). Lee und Van der Werf, 2005 verwendeten in ihren Simulationsstudien 5000 MCMC-Iterationen bei 10 Markern und Basispopulationen von 100, 200 und 800 Tieren in komplexen Pedigrees oder unverknüpften Pedigrees. Durch die MCMC-Iterationen soll das gesamte Spektrum möglicher Haplotypenkombinationen im komplexen Pedigree repräsentiert werden. Je größer Pedigree, Anzahl der untersuchten Marker und Anzahl der Allele pro Marker sind, desto mehr MCMC-Iterationen sind für eine Konvergenz zum globalen Optimum notwendig. Für dieses große Kartierungsprojekt mit 1253 Tieren und 33 Markern sind weit mehr als 5000 Iterationen für eine Konvergenz notwendig, jedoch war es hier aufgrund begrenzter Rechenleistung nicht möglich, mehr als 5000 Iterationen durchzuführen.

Eine Analyse mit den tatsächlich wahrscheinlichsten Haplotypen aus SimWalk2 spiegelt die Realität sehr viel genauer wider als durchschnittliche MCMC-Haplotypen. Die „unruhigere“ Likelihood Ratio (LR) Kurve aus der Auswertung mit LDLrams1.76 (s. Abb. 21) kann daher als ein Hinweis für eine nicht vollständige Konvergenz bewertet werden. Die deutlich glattere LR-Kurve aus der Auswertung mit LDL1.42 spricht für eine größere Vertrauenswürdigkeit dieses Ergebnisses.

Die Effizienz der LDL-Kartierung hängt stark vom Grad des LD ab. Mit steigender effektiver Populationsgröße nimmt der Sampling-Fehler der geschätzten Haplotypen zu, während das Linkage Disequilibrium abnimmt. Dies kann eine geringere Genauigkeit bei hohen effektiven Populationsgrößen erklären, ist aber durch eine höhere Markerdichte zu kompensieren (Lee und van der Werf, 2004).

Da Fleckvieh im Gegensatz zu Holstein-Friesian-Rindern eine vergleichsweise hohe effektive Populationsgröße hat, und daher relativ wenig Linkage-Disequilibrium aufweist, sind die Möglichkeiten der LD-Kartierung begrenzt. Mit niedriger LD gewinnt die Pedigree-Information mehr an Bedeutung (Lee und Van der Werf, 2005). Die Höhe der Likelihood Ratio und die Weite des Peaks variiert erheblich mit der Markerdichte, der Anzahl an Generationen und des Vorhandenseins eines gut verknüpften Pedigrees (Lee und van der Werf, 2004, 2005).

Die Präzision der Feinkartierung hängt erheblich von den Haplotypen der untersuchten Population und dem Grad der LD zwischen der für den QTL kausalen Mutation und den flankierenden Markern ab (Lee und van der Werf, 2004). Fehler können durch eine große Anzahl an unverwandten Founder-Tieren reduziert werden. Da wir ein relativ großes Halbgeschwister-Design (1253 Tiere, davon 565 Söhne aus den 11 GDD-Familien und 91 Tiere des 6 GP) mit knapp 600 Bullenmüttern, davon viele unverwandte Founder-Mütter, verwendet haben, sollte das Kartierungsergebnis der Analyse mit LDL1.42 eigentlich etwas genauer sein.

Leider decken sich die Kandidatengenregionen im distalen Bereich des Chromosoms nicht vollständig mit der Lokalisation des QTL für KVp und PP, jedoch ist die Markerdichte im Bereich von 65 -95 cM relativ niedrig.

Die Ergebnisse von Intervallkartierung, AIM und LDL stimmen im Großen und Ganzen mit den Angaben von Mosig et al., 2001 überein.

5.1.4 Kandidatengene für das Merkmal Proteinprozent

Als mögliches positionelles und funktionelles Kandidatengen für PP im distalen Bereich des Chromosoms zwischen 90 und 100 cM könnte der Östrogenrezeptor 1 alpha (ESR1, ER α) in Frage kommen. Eine Datenbankrecherche mit den wgs-Sequenzen verwendeter Marker und der ESR1-Sequenz konnte die Lokalisation des ESR1 zwischen die Marker URB028 und URB024 im Bereich von 97,285 bis 98,219 cM auf 1 cM eingrenzen. Möglich ist jedoch, dass durch die relativ geringe Markerdichte im Bereich von 80 – 95 cM der QTL nicht ganz genau kartiert werden

konnte und somit das Kandidatengen eher im Bereich um 90 cM lokalisiert sein sollte.

ESR1 ist jedoch aufgrund seiner Eigenschaft als Rezeptor des weiblichen Sexualhormons Östradiol-17beta, welches unter anderem die Entwicklung der Milchgänge und in Verbindung mit Progesteron Wachstum und Entwicklung des Alveolargewebes in der Milchdrüse stimuliert, trotzdem ein mögliches funktionelles und positionelles Kandidatengen (Schams et al., 2003).

ER α und ER β vermitteln hauptsächlich die genomische Aktivität des Östrogens. Beide Rezeptoren sind zu 96% homolog und erkennen dasselbe Östrogen-responsive Element auf genomischer DNA. Die Liganden-Bindungsstelle ist jedoch nur zu 60 % homolog mit daraus resultierender Selektivität gegenüber verschiedenen Liganden. ER α ist ein Aktivator der Transkription wobei ER β die Transkription hemmt (Saji et al., 2001).

Untersuchungen zu Expression und Lokalisation von Östrogen- und Progesteronrezeptoren an Milchdrüsen in verschiedenen Stadien von DFV- und HF-Tieren wurden von Schams et al., 2003 durchgeführt. Es wurde die Expression der mRNA von ER α , ER β und des Progesteronrezeptors (PR) im Western blot und das Rezeptor-Protein immunhistochemisch quantifiziert. Untersucht wurden Milchdrüsen unterschiedlicher Gruppen: 18 Monate alte, nicht gravide Färsen, Tiere im Graviditätszeitraum von Tag 194 – 213, Tiere von Tag 252 – 272, Tiere in Laktogenese (Tag 4 – 8 post partum), Galaktopoese, Tiere in der Hochlaktation (2 – 8 Wochen post partum), im mittleren Laktationsstadium (4 – 5 Monate post partum) in der Endlaktation (8 – 12 Monate post partum) und im Involutionsstadium der Milchdrüse zu verschiedenen Zeitpunkten (von 8 h bis 28 Tage). Es konnte eine hohe mRNA-Expression von ER α und PR im Drüsengewebe von nicht graviden Färsen nachgewiesen werden. Mit Beginn der Laktation sank der hohe Level an ER α und PR. Die Expression von ER β war im Vergleich generell um ein Vielfaches niedriger. Es wird vermutet, dass ER α und PR eine sehr wichtige Rolle in der Mammogenese spielen. Schon frühere Untersuchungen bei Rindern und Schafen durch künstliche Induktion der Laktation bei nicht graviden Tieren mit den Liganden Östrogen und Progesteron legten diese Vermutung nahe (Erb, 1977). Die Induktion der Entwicklung von alveolärem Gewebe konnte durch Behandlung juveniler Schafe mit Östrogen und Progesteron erwirkt werden, eine Gabe von Prolaktin war dazu nicht notwendig (Schams, 1976; Schams et al., 1984). Progesteron alleine zeigte

keinen Effekt auf die Entwicklung alveolärer Areale. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination aus Östrogen und Progesteron essentiell für die Entwicklung der Milchdrüse ist.

Die Untersuchungen von Schams et al., 2003 mit hohen Leveln von ER α , ER β und PR vor der lobulo-alveolären Entwicklung der Milchdrüse und die deutlich niedrigeren Konzentrationen während der Gravidität und Laktogenese weisen auf eine wichtige Rolle für die Initiation der Milchdrüsenentwicklung hin. Möglicherweise könnten sich phänotypische Variationen innerhalb der Milchdrüse durch Unterschiede in der Entwicklung auch auf die Zusammensetzung der Milch selbst auswirken.

5.2 BTA29

5.2.1 Totgeburt und Kalbeverlauf paternal

5.2.1.1 IGF2

Im distalen Bereich von BTA29 befindet sich der insulin-like growth factor 2 (IGF2) auf der Position 29qter (Schmutz et al., 1996).

IGF2 wird eine Schlüsselrolle im fetalen Größenwachstum zugeschrieben und weist eine Vielzahl metabolischer und differenzierender Aktivitäten in vielen fetalen Geweben auf. Chromosom 29 wurde aufgrund dessen, und der Tatsache, dass IGF2R ein Kandidatengen auf BTA09 darstellt, für die QTL-Kartierung ausgewählt.

IGF2 ist gewebespezifisch imprintiert: Imprinting konnte z.B. nicht im fetalen Gehirn von Schaf und Rind beobachtet werden. Ein Wechsel vom Imprinting eines Allels in utero zu einer biallelen Expression postnatal wurde in Lebergewebe von Schafen, Rindern und dem Menschen nachgewiesen (Fowden, 2002). Bei IGF2 wird das paternale Allel exprimiert, das maternale Allel weist genomisches Imprinting auf (Dindot et al., 2004).

Der Intervallkartierung mit QTLexpress nach zu schließen segregiert jedoch kein QTL für Totgeburt bzw. Kalbeverlauf in der Fleckviehpopulation auf BTA29. Bisher wurde auch kein QTL von anderen Autoren in anderen Rinderpopulationen mit einem Effekt

auf Totgeburt bzw. Kalbeverlauf auf BTA29 beschrieben. Lediglich Schrooten et al., 2003 kartierten einen QTL mit Effekt auf Geburtsgewicht auf BTA29.

Eine Rolle von IGF2 als mögliches Kandidatengen für Totgeburt und Kalbeverlauf in der Fleckviehpopulation konnte in dieser Untersuchung also nicht nachgewiesen werden.

5.2.2 Milchmenge und Milchinhaltsstoffe

Verschiedene Veröffentlichungen berichten über QTL mit Effekt auf Milchmenge und -inhaltsstoffe auf Chromosom 29. QTL mit Effekt auf Milchmenge, Proteinmenge, Proteinprozent, Fettmenge und Anzahl somatischer Zellen werden in US- und Israeli Holstein-Friesian beschrieben (Ashwell et al., 2004; Heyen et al., 1999; Khatkar et al., 2004; Mosig et al., 2001). Bislang wurde jedoch kein QTL für Fettprozent auf BTA29 in der Literatur angeführt.

Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $0,01 < P < 0,05$ ist der auf BTA29 in der Fleckviehpopulation kartierte QTL für Fettprozent marginal signifikant.

Wenige QTL-Kartierungsvorhaben wurden bisher mit der Rasse Fleckvieh durchgeführt. Eine QTL-Kartierung zur Fleckenverteilung des Fells (Reinsch et al., 1999) und eine Untersuchung zur Fettverteilung und Zartheit des Fleisches (Stone et al., 2005) wurden bereits für die Rasse Fleckvieh vorgenommen.

Die Zweinutzungsrasse Fleckvieh, als eine eher regional verbreitete Rasse Süddeutschlands, wird im Gegensatz zu den weltweit verbreiteten Holstein-Friesians mit durchschnittlich bedeutend höherer Milchleistung bei der QTL-Kartierung wenig beachtet. Durch die steigende Verwendung von Fleckvieh-Tieren im Ausland sowie in Gebrauchskreuzungen zur Erhöhung des Fleischanteils bzw. der Mastleistung und zur Verbesserung der Fitness könnte die QTL-Kartierung in dieser Rasse zukünftig mehr an Bedeutung gewinnen.

5.3 Abschließende Bemerkungen

Die Totgeburtenrate in der Fleckviehpopulation stieg in den letzten 25 Jahren und stagniert seit etwa 5 Jahren. Bei Fleckviehfärsen liegt sie momentan bei etwa 7%, bei Kühen um 3,5%. Verglichen mit anderen Rassen, wo Totgeburtenraten von über 10% beschrieben werden (vor allem Holstein-Friesian Rinder), ist die Totgeburtenrate beim Fleckvieh noch relativ gering. Dies ist jedoch kein Grund, diese trotzdem recht hohe Totgeburtenrate in Kauf zu nehmen.

Die Selektion auf Kalbeverlauf und Totgeburt ist zudem aufgrund der Trennung des Merkmals in einen paternalen und maternalen Teil recht problematisch. Wenn gegen hohe Zuchtwerte für paternalen Kalbeverlauf, bzw. paternale Totgeburt selektiert wird, wird hauptsächlich auf kleine Kälber selektiert. Diese kleinen Kälber werden möglicherweise zu relativ kleinen Kühen heranwachsen, die bei Geburten mit normalgroßen Kälbern Schwierigkeiten haben könnten. Ein wesentlicher Fortschritt wäre die Anwendung von marker- und gengestützter Selektion (MAS und GAS) mit gezielter Selektion gegen kausale Allele oder Haplotypen. MAS und GAS sind vor allem bei Merkmalen mit niedrigen Heritabilitäten und schwer durchführbarer Erfassung sehr geeignet. Damit wäre eine sehr viel gezieltere Selektion auf Kalbeverlauf und Totgeburt möglich.

Es gibt noch viele offene Fragen, die im Bereich Totgeburten und Kalbeverlauf zu klären sind. Da unsere Arbeitshypothese eine Störung des paternalen Imprintingmechanismus impliziert und mit der LDL-Kartierung wenig zusätzliche Information erzielt werden konnte, muss ein besseres Kartierungsmodell erstellt werden. Möglich wäre, weitere und kleinere Halbgeschwisterfamilien zu analysieren um mehr Rekombinationen in den paternalen Haplotypen beobachten zu können. Aus dem von uns verwendeten Kartierungsdesign kann nur noch wenig zusätzliche Information geholt werden.

Expressionsanalysen und Einzelgenanalysen in Kälbern wurden bereits von einigen Autoren beschrieben. Expressionsanalysen von Feten ausgewählter Bullen werden derzeit durchgeführt. Ebenfalls interessant wären weitergehende Untersuchungen, inwieweit ein genetisch bedingtes Äquivalent zum Large Offspring Syndrome bei Kälbern aus künstlicher Besamung auftritt. Eine umfassende und viel präzisere Erfassung von Totgeburten wurde durch das Monitoring totgeborener und

missgebildeter Kälber des LKV Bayern mit Vermessungen dieser Kälber durch den Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. gemacht.

Mit dieser Arbeit wurde ein Anfang in Richtung des besseren Verständnisses dieser Merkmale gemacht. Es ist wichtig, weitergehende Forschungen zu betreiben und kausale Ursachen für Kalbeverlauf und Totgeburt zu evaluieren.

Aufgrund tierschützerischer als auch wirtschaftlicher Aspekte sollten die Merkmale Totgeburt und Kalbeverlauf in Zukunft weiterhin genau beobachtet und untersucht werden, um eine so hohe Totgeburtenrate wie bei Holstein-Friesian Rindern zu vermeiden.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Kartierung eines QTL mit Effekt auf paternalen Kalbeverlauf und paternale Totgeburt auf Bos Taurus Autosom 9 (BTA09) in einer fortgeschrittenen Fleckvieh x Red-Holstein Rückkreuzungspopulation mit positioneller und funktioneller Kandidatengenanalyse.

Dazu wurden Untersuchungen mit verschiedenen Kartierungsdesigns in Granddaughter und Daughter Designs durchgeführt. Intervallkartierung und Linkage / Linkage-Disequilibrium-Kartierung wurden verwendet um den QTL feinkartieren zu können. Die LDL-Kartierung wurde in Ansätzen mit MCMC-geschätzten (durchschnittlichen) und wahrscheinlichsten Haplotypen durchgeführt.

Mit der Intervallkartierung konnten zwei signifikante QTL für paternalen Kalbeverlauf und paternale Totgeburt auf BTA09 lokalisiert werden: ein QTL im proximalen Bereich und ein QTL im distalen Bereich des Chromosoms. Die Ergebnisse der LDL-Kartierung weisen auf nur einen signifikanten QTL im distalen Bereich von BTA09 hin.

Als mögliches funktionelles und positionelles Kandidatengen für den distalen QTL mit Effekt auf paternalen Kalbeverlauf und Totgeburt konnte IGF2R als Rezeptor des insuline-like growth factor 2 evaluiert werden. Einflüsse von IGF2R auf das fetale und embryonale Wachstum wurden beschrieben.

Die Intervallkartierung auf BTA29 - das IGF2-Hormon codierende Chromosom - ließ auf keinen QTL mit Effekt auf Kalbeverlauf oder Totgeburt schließen.

Auf BTA09 wurde neben den QTL für paternalen Kalbeverlauf und paternale Totgeburt mit Intervallkartierung und Approximativem Interval-Mapping zwei QTL mit Effekt auf Proteinprozent kartiert. Diese QTL sind ebenfalls im proximalen und distalen Bereich des Chromosoms lokalisiert. Die LDL-Kartierung konnte nur einen QTL mit Effekt auf Proteinprozent im distalen Bereich bestätigen.

Ein mögliches funktionelles und positionelles Kandidatengen im distalen Bereich des Chromosoms stellt der Östrogenrezeptor ESR1 (ER α) dar. ESR1 nimmt nachweislich großen Einfluss in der Entwicklung des alveolären Gewebes in der bovinen Milchdrüse.

7 Summary

QTL mapping and functional candidate gene analysis for the trait stillbirth in an advanced Fleckvieh x Red-Holstein backcross population

The aim of this study was the mapping of a QTL affecting paternal stillbirth and paternal calving ease on Bos Taurus Autosome 9 (BTA09) in an advanced Fleckvieh x Red-Holstein backcross population with positional and functional candidate gene analysis.

For that purpose analyses with different mapping designs were accomplished in a granddaughter- and daughter design. We used interval mapping and a combined linkage / linkage disequilibrium mapping approach to finemap the QTL. The LDL mapping was conducted with MCMC-sampled and with most probable haplotypes.

With the interval mapping there were two significant QTL affecting paternal calving ease and paternal stillbirth on BTA09, one QTL located at the proximal part and one QTL located at the distal part of the chromosome. Results from LDL mapping suggest only one significant QTL for paternal calving ease at the distal part of the chromosome.

A possible functional and positional candidate gene for the distal QTL affecting paternal calving ease and paternal stillbirth is IGF2R, the receptor of the insuline-like growth factor 2. Influences of IGF2R on embryonal and fetal growth have been described.

Results from interval mapping on BTA29, harbouring the IGF2 hormone coding region, do not infer a QTL with effect on stillbirth or calving ease.

Besides paternal stillbirth and paternal calving ease we could locate two QTL affecting protein percentage with interval mapping and approximate interval mapping. These QTL are also located on the proximal and distal part of the chromosome. LDL mapping could only confirm the QTL on the distal part.

A possible functional and positional candidate gene in the distal part of BTA09 is the estrogen receptor 1 (ESR1, ER α). ESR1 was demonstrated to strongly affect development and formation of the alveolar tissue in the bovine mammary gland.

8 Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-10.
- Andersson, L. (2001): Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat Rev Genet* 2, 130-8.
- Andersson, L. und Georges, M. (2004): Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nat Rev Genet* 5, 202-12.
- Ashwell, M. S., Heyen, D. W., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., Da, Y., VanRaden, P. M., Ron, M., Weller, J. I. und Lewin, H. A. (2004): Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 87, 468-75.
- Ashwell, M. S., Heyen, D. W., Weller, J. I., Ron, M., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P. und Lewin, H. A. (2005): Detection of quantitative trait loci influencing conformation traits and calving ease in Holstein-Friesian cattle. *J Dairy Sci* 88, 4111-9.
- Aumann, J., Thaller, G. und Fürst, C. (1996): Zuchtwertschätzung für Fruchtbarkeit und Kalbeverlauf, 1. Seminar des genetischen Ausschusses der ZAR 1996, <http://www.zar.at/article/articleview/44278/1/306>.
- Barendse, W., Armitage, S. M., Kossarek, L. M., Shalom, A., Kirkpatrick, B. W., Ryan, A. M., Clayton, D., Li, L., Neibergs, H. L., Zhang, N. und et al. (1994): A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet* 6, 227-35.
- Bennewitz, J., Reinsch, N., Grohs, C., Leveziel, H., Malafosse, A., Thomsen, H., Xu, N., Looft, C., Kuhn, C., Brockmann, G. A., Schwerin, M., Weimann, C., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Forster, M., Brenig, B., Reinhardt, F., Reents, R., Averdunk, G., Blumel, J., Boichard, D. und Kalm, E. (2003): Combined analysis of data from two granddaughter designs: A simple strategy for QTL confirmation and increasing experimental power in dairy cattle. *Genet Sel Evol* 35, 319-38.
- Bertolini, M. und Anderson, G. B. (2002): The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology* 57, 181-7.
- Blott, S., Kim, J. J., Moisisio, S., Schmidt-Kuntzel, A., Cornet, A., Berzi, P., Cambisano, N., Ford, C., Grisart, B., Johnson, D., Karim, L., Simon, P., Snell, R., Spelman, R., Wong, J., Vilkki, J., Georges, M., Farnir, F. und Coppieters, W. (2003): Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics* 163, 253-66.
- Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Huhne, J. und Rolf, B. (1998): Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 62, 1408-15.
- Butler, J. M. (2005): Constructing STR multiplex assays. *Methods Mol Biol* 297, 53-66.
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C. R., Lim, E. P., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, G. Q. und Lander, E. S. (1999): Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22, 231-8.
- Cezar, G. G., Bartolomei, M. S., Forsberg, E. J., First, N. L., Bishop, M. D. und Eilertsen, K. J. (2003): Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 68, 1009-14.
- Constancia, M., Pickard, B., Kelsey, G. und Reik, W. (1998): Imprinting mechanisms. *Genome Res* 8, 881-900.

- Darvasi, A. und Soller, M. (1992): Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. *Theor. Appl. Genet.* 85, 353-59.
- Darvasi, A. und Soller, M. (1994): Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics* 138, 1365-73.
- Dekkers, J. C. und Hospital, F. (2002): The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat Rev Genet* 3, 22-32.
- Dekkers, J. C. (2004): Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J Anim Sci* 82 E-Suppl, E313-328.
- Dindot, S. V., Kent, K. C., Evers, B., Loskutoff, N., Womack, J. und Piedrahita, J. A. (2004): Conservation of genomic imprinting at the XIST, IGF2, and GTL2 loci in the bovine. *Mamm Genome* 15, 966-74.
- Dolezal, M., Schwarzenbacher, H., Sölkner, J. und Visscher, P. M. (2005): An approximate interval mapping procedure for selective DNA pooling, 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Uppsala, Sweden, 5.6.-8.6. 2005, EAAP-Book of Abstracts, 11, 118.
- Emmerling, R. und ZuchtData GmbH (2005): Zuchtwertschätzung beim Rind, Beschreibung der Grundlagen, Methoden und Modelle, Zuchtwertschätzung Milch und Persistenz, ZuchtData EDV-Dienstleistungen GmbH, Wien;
<http://www.zar.at/article/articleview/2382/1/306>.
- Erb, R. E. (1977): Hormonal control of mammarygenesis and onset of lactation in cows - a review. *J Dairy Sci* 60, 155-69.
- Eriksson, S., Naisholm, A., Johansson, K. und Philipsson, J. (2004a): Genetic parameters for calving difficulty, stillbirth, and birth weight for Hereford and Charolais at first and later parities. *J Anim Sci* 82, 375-83.
- Eriksson, S., Nasholm, A., Johansson, K. und Philipsson, J. (2004b): Genetic relationships between calving and carcass traits for Charolais and Hereford cattle in Sweden. *J Anim Sci* 82, 2269-76.
- Farin, C. E., Farin, P. W. und Piedrahita, J. A. (2004): Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. *J Anim Sci* 82 E-Suppl, E53-62.
- Farnir, F., Coppieters, W., Arranz, J. J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Mni, M., Nezer, C., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D. und Georges, M. (2000): Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Res* 10, 220-7.
- Farnir, F., Grisart, B., Coppieters, W., Riquet, J., Berzi, P., Cambisano, N., Karim, L., Mni, M., Moio, S., Simon, P., Wagenaar, D., Viikki, J. und Georges, M. (2002): Simultaneous mining of linkage and linkage disequilibrium to fine map quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: revisiting the location of a quantitative trait locus with major effect on milk production on bovine chromosome 14. *Genetics* 161, 275-87.
- Flint, J. und Mott, R. (2001): Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat Rev Genet* 2, 437-45.
- Fowden, A. (2002): Insulin-like growth factors and fetoplacental growth. Imprinting and Growth Congress. London,
<http://www.geneimprint.com/meetings/2002london/speakerabsts/fowden.html>.
- Fürst, C., Egger-Danner, C. und ZuchtData GmbH (2003): Zuchtwertschätzung Kalbeverlauf und Totgeburtenrate, <http://www.zar.at/article/archive/1159>,
<http://www.zar.at/download/ZWS/Kalbeverlauf.pdf>.

- Gautier, M., Barcelona, R. R., Fritz, S., Grohs, C., Druet, T., Boichard, D., Eggen, A. und Meuwissen, T. H. (2006): Fine mapping and physical characterization of two linked quantitative trait loci affecting milk fat yield in dairy cattle on BTA26. *Genetics* 172, 425-36.
- Geldermann, H. (1975): Investigations of quantitative characters in animals by gene markers. *Theor Appl Genet* 46, 319-330.
- George, A. W., Visscher, P. M. und Haley, C. S. (2000): Mapping quantitative trait loci in complex pedigrees: a two-step variance component approach. *Genetics* 156, 2081-92.
- Georges, M., Nielsen, D., Mackinnon, M., Mishra, A., Okimoto, R., Pasquino, A. T., Sargeant, L. S., Sorensen, A., Steele, M. R., Zhao, X. und et al. (1995): Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139, 907-20.
- Greve, T. und Callesen, H. (2005): Embryo technology: implications for fertility in cattle. *Rev Sci Tech* 24, 405-12.
- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M. und Snell, R. (2002): Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res* 12, 222-31.
- Hansen, M., Lund, M. S., Pedersen, J. und Christensen, L. G. (2004a): Genetic parameters for stillbirth in Danish Holstein cows using a Bayesian threshold model. *J Dairy Sci* 87, 706-16.
- Hansen, M., Misztal, I., Lund, M. S., Pedersen, J. und Christensen, L. G. (2004b): Undesired phenotypic and genetic trend for stillbirth in Danish Holsteins. *J Dairy Sci* 87, 1477-86.
- Hayes, B. J., Kinghorn, B. P. und Ruvinsky, A. (2005): Genome scanning for quantitative trait loci, CAB International, UK. p. 507 - 537, <http://www-personal.une.edu.au/~aruvinsk/Mammalian%20-%20Chap%2020.pdf>.
- Heyen, D. W., Weller, J. I., Ron, M., Band, M., Beever, J. E., Feldmesser, E., Da, Y., Wiggans, G. R., VanRaden, P. M. und Lewin, H. A. (1999): A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol Genomics* 1, 165-75.
- Hiendleder, S., Thomsen, H., Reinsch, N., Bennewitz, J., Leyhe-Horn, B., Looft, C., Xu, N., Medjugorac, I., Russ, I., Kuhn, C., Brockmann, G. A., Blumel, J., Brenig, B., Reinhardt, F., Reents, R., Averdunk, G., Schwerin, M., Forster, M., Kalm, E. und Erhardt, G. (2003): Mapping of QTL for Body Conformation and Behavior in Cattle. *J Hered* 94, 496-506.
- Hiendleder, S., Mund, C., Reichenbach, H. D., Wenigerkind, H., Brem, G., Zakhartchenko, V., Lyko, F. und Wolf, E. (2004): Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod* 71, 217-23.
- Hirschhorn, J. N. (2005): Genetic approaches to studying common diseases and complex traits. *Pediatr Res* 57, 74R-77R.
- Hoeschele, I., Uimari, P., Grignola, F. E., Zhang, Q. und Gage, K. M. (1997): Advances in statistical methods to map quantitative trait loci in outbred populations. *Genetics* 147, 1445-57.

- Holtkemper, U., Rolf, B., Hohoff, C., Forster, P. und Brinkmann, B. (2001): Mutation rates at two human Y-chromosomal microsatellite loci using small pool PCR techniques. *Hum Mol Genet* 10, 629-33.
- 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. und Sugimoto, Y. (2004): A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res* 14, 1987-98.
- Kashi, Y., Hallermann, E. und Soller, M. (1990): Marker assisted selection of candidate young bulls for progeny testing programmes. *Anim Prod* 51, 63-74.
- Khatkar, M. S., Thomson, P. C., Tammen, I. und Raadsma, H. W. (2004): Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet Sel Evol* 36, 163-90.
- Killian, J. K. und Jirtle, R. L. (1999): Genomic structure of the human M6P/IGF2 receptor. *Mamm Genome* 10, 74-7.
- Killian, J. K., Nolan, C. M., Wylie, A. A., Li, T., Vu, T. H., Hoffman, A. R. und Jirtle, R. L. (2001): Divergent evolution in M6P/IGF2R imprinting from the Jurassic to the Quaternary. *Hum Mol Genet* 10, 1721-8.
- Kneeland, J., Li, C., Basarab, J., Snelling, W. M., Benkel, B., Murdoch, B., Hansen, C. und Moore, S. S. (2004): Identification and fine mapping of quantitative trait loci for growth traits on bovine chromosomes 2, 6, 14, 19, 21, and 23 within one commercial line of *Bos taurus*. *J Anim Sci* 82, 3405-14.
- Krebs, S., Medugorac, I., Russ, I., Ossent, P., Bleul, U., Schmahl, W. und Forster, M. (2006): Fine-mapping and candidate gene analysis of bovine spinal muscular atrophy. *Mamm Genome* 17, 67-76.
- Kühn, C., Bennewitz, J., Reinsch, N., Xu, N., Thomsen, H., Looft, C., Brockmann, G. A., Schwerin, M., Weimann, C., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Forster, M., Brenig, B., Reinhardt, F., Reents, R., Russ, I., Averdunk, G., Blumel, J. und Kalm, E. (2003): Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. *J Dairy Sci* 86, 360-8.
- Landegren, U., Nilsson, M. und Kwok, P. Y. (1998): Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res* 8, 769-76.
- Lander, E. S. und Botstein, D. (1989): Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-99.
- Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruip, T., Niemann, H. und Galli, C. (2002): Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* 67, 767-75.
- Lee, S. H. und van der Werf, J. H. (2004): The efficiency of designs for fine-mapping of quantitative trait loci using combined linkage disequilibrium and linkage. *Genet Sel Evol* 36, 145-61.
- Lee, S. H. und Van der Werf, J. H. (2005): The role of pedigree information in combined linkage disequilibrium and linkage mapping of quantitative trait loci in a general complex pedigree. *Genetics* 169, 455-66.
- Lee, S. H. und Van der Werf, J. H. (2006a): Simultaneous fine mapping of multiple closely linked quantitative trait Loci using combined linkage disequilibrium and linkage with a general pedigree. *Genetics* 173, 2329-37.
- Lee, S. H. und Van der Werf, J. H. (2006b): Using dominance relationship coefficients based on linkage disequilibrium and linkage with a general complex pedigree to increase mapping resolution. *Genetics*.

- Lipkin, E., Shalom, A., Khatib, H., Soller, M. und Friedmann, A. (1993): Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* **76**, 2025-32.
- Lipkin, E., Mosig, M. O., Darvasi, A., Ezra, E., Shalom, A., Friedmann, A. und Soller, M. (1998): Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective milk DNA pooling using dinucleotide microsatellite markers: analysis of milk protein percentage. *Genetics* **149**, 1557-67.
- Lynch, M. und Walsh, B. (1998): *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Medugorac, I., Kemter, J., Russ, I., Pietrowski, D., Nuske, S., Reichenbach, H. D., Schmahl, W. und Forster, M. (2003): Mapping of the bovine spinal muscular atrophy locus to Chromosome 24. *Mamm Genome* **14**, 383-91.
- Meijering, A. (1984): Dystocia and stillbirth in cattle - A review of causes, relations and implications. *Livest. Prod. Sci.* **11**, 143-177.
- Meuwissen, T. H. und Goddard, M. E. (2000): Fine mapping of quantitative trait loci using linkage disequilibria with closely linked marker loci. *Genetics* **155**, 421-30.
- Meuwissen, T. H. und Goddard, M. E. (2001): Prediction of identity by descent probabilities from marker-haplotypes. *Genet Sel Evol* **33**, 605-34.
- Meuwissen, T. H., Karlsen, A., Lien, S., Olsaker, I. und Goddard, M. E. (2002): Fine mapping of a quantitative trait locus for twinning rate using combined linkage and linkage disequilibrium mapping. *Genetics* **161**, 373-9.
- Meuwissen, T. H. (FAO): *Genomic Selection: The Future of Marker Assisted Selection and Animal Breeding*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/biotech/docs/Meuwissen.pdf>.
- Meyer, C. L., Berger, P. J. und Koehler, K. J. (2000): Interactions among factors affecting stillbirths in Holstein cattle in the United States. *J Dairy Sci* **83**, 2657-63.
- Meyer, C. L., Berger, P. J., Koehler, K. J., Thompson, J. R. und Sattler, C. G. (2001): Phenotypic trends in incidence of stillbirth for Holsteins in the United States. *J Dairy Sci* **84**, 515-23.
- Moore, T. und Reik, W. (1996): Genetic conflict in early development: parental imprinting in normal and abnormal growth. *Rev Reprod* **1**, 73-7.
- Moore, T. (2001): Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. *Reproduction* **122**, 185-93.
- Mosig, M. O., Lipkin, E., Khutoreskaya, G., Tchourzyna, E., Soller, M. und Friedmann, A. (2001): A whole genome scan for quantitative trait loci affecting milk protein percentage in Israeli-Holstein cattle, by means of selective milk DNA pooling in a daughter design, using an adjusted false discovery rate criterion. *Genetics* **157**, 1683-98.
- Nugent, R. A., 3rd und Notter, D. R. (1991): Body measurements of crossbred calves sired by Simmental bulls divergently selected for progeny first-calf calving ease in relation to birth weight. *J Anim Sci* **69**, 2422-33.
- Olsen, H. G., Gomez-Raya, L., Vage, D. I., Olsaker, I., Klunghand, H., Svendsen, M., Adnoy, T., Sabry, A., Klemetsdal, G., Schulman, N., Kramer, W., Thaller, G., Ronningen, K. und Lien, S. (2002): A genome scan for quantitative trait loci affecting milk production in Norwegian dairy cattle. *J Dairy Sci* **85**, 3124-30.
- Olsen, H. G., Lien, S., Svendsen, M., Nilsen, H., Roseth, A., Aasland Opsal, M. und Meuwissen, T. H. (2004): Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. *J Dairy Sci* **87**, 690-8.

- Olsen, H. G., Lien, S., Gautier, M., Nilsen, H., Roseth, A., Berg, P. R., Sundsaasen, K. K., Svendsen, M. und Meuwissen, T. H. (2005): Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. *Genetics* 169, 275-83.
- Plante, Y., Gibson, J. P., Nadesalingam, J., Mehrabani-Yeganeh, H., Lefebvre, S., Vandervoort, G. und Jansen, G. B. (2001): Detection of quantitative trait loci affecting milk production traits on 10 chromosomes in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 84, 1516-24.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E. und Taberlet, P. (2005): Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* 6, 847-59.
- Reik, W., Dean, W. und Walter, J. (2001): Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089-93.
- Reik, W. und Walter, J. (2001): Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2, 21-32.
- Reinsch, N., Thomsen, H., Xu, N., Brink, M., Looft, C., Kalm, E., Brockmann, G. A., Grupe, S., Kuhn, C., Schwerin, M., Leyhe, B., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Forster, M., Reents, R. und Averdunk, G. (1999): A QTL for the degree of spotting in cattle shows synteny with the KIT locus on chromosome 6. *J Hered* 90, 629-34.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-86.
- Ruitberg, C. M., Reeder, D. J. und Butler, J. M. (2001): STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res* 29, 320-2.
- Saji, S., Sakaguchi, H., Andersson, S., Warner, M. und Gustafsson, J. (2001): Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat mammary gland. *Endocrinology* 142, 3177-86.
- Schams, D. (1976): Hormonal control of lactation. *Ciba Found Symp*, 27-48.
- Schams, D., Russe, I., Schallenberger, E., Prokopp, S. und Chan, J. S. (1984): The role of steroid hormones, prolactin and placental lactogen on mammary gland development in ewes and heifers. *J Endocrinol* 102, 121-30.
- Schams, D., Kohlenberg, S., Amselgruber, W., Berisha, B., Pfaffl, M. W. und Sinowatz, F. (2003): Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J Endocrinol* 177, 305-17.
- Schmalzing, D., Koutny, L., Adourian, A., Belgrader, P., Matsudaira, P. und Ehrlich, D. (1997): DNA typing in thirty seconds with a microfabricated device. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10273-8.
- Schmutz, S. M., Moker, J. S., Gallagher, D. S., Jr., Kappes, S. M. und Womack, J. E. (1996): In situ hybridization mapping of LDHA and IGF2 to cattle chromosome 29. *Mamm Genome* 7, 473.
- Schnabel, R. D., Kim, J. J., Ashwell, M. S., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., Connor, E. E. und Taylor, J. F. (2005a): Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: analysis of the bovine osteopontin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6896-901.
- Schnabel, R. D., Sonstegard, T. S., Taylor, J. F. und Ashwell, M. S. (2005b): Whole-genome scan to detect QTL for milk production, conformation, fertility and functional traits in two US Holstein families. *Anim Genet* 36, 408-16.

- Schrooten, C., Bovenhuis, H., Coppieters, W. und Van Arendonk, J. A. (2000): Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. *J Dairy Sci* 83, 795-806.
- Schrooten, C., Bink, M. C. und Bovenhuis, H. (2004): Whole genome scan to detect chromosomal regions affecting multiple traits in dairy cattle. *J Dairy Sci* 87, 3550-60.
- Seaton, G., Haley, C. S., Knott, S. A., Kearsley, M. und Visscher, P. M. (2002): QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* 18, 339-40.
- Steinbock, L., Nasholm, A., Berglund, B., Johansson, K. und Philipsson, J. (2003): Genetic effects on stillbirth and calving difficulty in Swedish Holsteins at first and second calving. *J Dairy Sci* 86, 2228-35.
- Stone, R. T., Casas, E., Smith, T. P., Keele, J. W., Harhay, G., Bennett, G. L., Koohmaraie, M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D. und Snelling, W. M. (2005): Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *J Anim Sci* 83, 2280-8.
- Tanksley, S. D. (1993): Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 27, 205-33.
- Thomsen, H., Reinsch, N., Xu, N., Bennewitz, J., Looft, C., Grupe, S., Kuhn, C., Brockmann, G. A., Schwerin, M., Leyhe-Horn, B., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Forster, M., Brenig, B., Reinhardt, F., Reents, R., Blumel, J., Averdunk, G. und Kalm, E. (2001): A whole genome scan for differences in recombination rates among three *Bos taurus* breeds. *Mamm Genome* 12, 724-8.
- Van der Werf, J. H. und Kinghorn, B. P. (2000): Identifying and incorporating genetic markers and major genes in animal breeding programs. QTL Course. Belo Horizonte, Brasil, <http://www-personal.une.edu.au/~jvanderw/brazilcourse.html>.
- Van Tassell, C. P., Ashwell, M. S. und Sonstegard, T. S. (2000): Detection of putative loci affecting milk, health, and conformation traits in a US Holstein population using 105 microsatellite markers. *J Dairy Sci* 83, 1865-72.
- Van Tassell, C. P., Sonstegard, T. S. und Ashwell, M. S. (2004): Mapping quantitative trait loci affecting dairy conformation to chromosome 27 in two Holstein grandsire families. *J Dairy Sci* 87, 450-7.
- Visscher, P. M. (2003): Principles of QTL mapping. QTL mapping course. Salzburg.
- Weller, J. I., Kashi, Y. und Soller, M. (1990): Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J Dairy Sci* 73, 2525-37.
- Willadsen, S. M., Janzen, R. E., McAlister, R. J., Shea, B. F., Hamilton, G. und McDermand, D. (1991): The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 35, 161-70.
- Winter, A., Kramer, W., Werner, F. A., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J. E., Thaller, G. und Fries, R. (2002): Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9300-5.
- Wolf, E. (2005): Nutztiere - quo vadite? Neue Wege durch funktionale Genomanalyse, www.fugato-forschung.de/download.php/29/nutztiere_wolf_neu.pdf.
- Wutz, A., Smrzka, O. W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner E. F. und Barlow D. P. (1997): Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 389, 745-9.

-
- Young, L. E., Sinclair, K. D. und Wilmut, I. (1998): Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 3, 155-63.
- Young, L. E., Fernandes, K., McEvoy, T. G., Butterwith, S. C., Gutierrez, C. G., Carolan, C., Broadbent, P. J., Robinson, J. J., Wilmut, I. und Sinclair, K. D. (2001): Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27, 153-54.
- Young, L. E., Schnieke, A. E., McCreath, K. J., Wieckowski, S., Konfortova, G., Fernandes, K., Ptak, G., Kind, A. J., Wilmut, I., Loi, P. und Feil, R. (2003): Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev* 120, 1433-42.
- Zhang, Q., Boichard, D., Hoeschele, I., Ernst, C., Eggen, A., Murkve, B., Pfister-Genskow, M., Witte, L. A., Grignola, F. E., Uimari, P., Thaller, G. und Bishop, M. D. (1998): Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. *Genetics* 149, 1959-73.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. Martin Förster möchte ich recht herzlich für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes, seines fachlichen Rats sowie der Durchsicht der Arbeit danken.

Herrn Dr. Ivica Međugorac danke ich sehr für die gute Betreuung, für immer konstruktive Ratschläge, seine fachliche Hilfe bei statistischen Fragen und Problemen aller Art sowie für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ebenfalls möchte ich mich sehr bei Dr. Stefan Krebs für seine geduldigen und anschaulichen Erklärungen sowie seine jederzeit freundliche Bereitschaft zur Diskussion und Hilfe bedanken.

Bei meinen Mitstreitern Stela Masle und Marijo Vrebac sowie Dr. Doris Seichter, Dr. Angelika Gabler und Herrn Stanglmeier möchte ich mich für die mir entgegengebrachte Geduld, Hilfe, Freundlichkeit und Freundschaft bedanken.

Dem technischen Personal Frau Andorfer, Frau Damian, Herrn Dinkel, Frau Nanou, Frau Niedenführ, Frau Schröter und Frau Zierahn danke ich herzlich für ihre stets gewährte Hilfe in Laborfragen, ihre Unterstützung und ein hervorragendes Arbeitsklima.

Herrn Volker Zierahn danke ich sehr für seine Hilfe bei der Korrektur orthographischer Fehler.

PD Dr. Stefan Hiendleder danke ich für seine interessanten Anregungen und Ausführungen zum Thema sowie der Bereitstellung von Primersequenzen und Markerinformationen.

Dr. Reiner Emmerling und dem Institut für Tierzucht der Landesanstalt für Landwirtschaft Bayern in Grub sowie Dr. Christian Fürst von der ZuchtData GmbH in Wien möchte ich für die Bereitstellung von Zuchtwertschätzungsdaten und ihre zuvorkommende Hilfsbereitschaft bei der Berechnung und Schätzung von „Sonderwünschen“ danken.

Der Tierzuchtforschung Grub e.V. und den beteiligten Besamungsstationen danke ich für die Bereitstellung von Probenmaterial.

Sehr dankbar bin ich meinen Freunden und ehemaligen Kommilitonen für ihre allzeit gewährte Unterstützung, ihren Rat, ihr Verständnis und nie versiegenden Humor.

Meinen Eltern, meinem Bruder Ralf und meiner Oma möchte ich von ganzem Herzen für die immer gewährte seelische und finanzielle Unterstützung, ihren Rückhalt, ihr Vertrauen und ihre Hilfe danken.

Diese Arbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung des Projektes „FUGATO – Fertilink“, Forschungszentrum Jülich (Projektnummer 0313388) und teilweise durch Gelder des EU-Projektes „BovMAS“ (Projektnummer QLK5-CT-2001-02379) ermöglicht.

Lebenslauf

Name: Gomeringer
Vorname: Verena
Geburtsdatum: 4. September 1978
Geburtsort: Sigmaringen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Franz Gomeringer, Industriemechaniker
Roswitha Gomeringer, Postangestellte
Geschwister: Ralf Gomeringer, Dipl. Wirtschaftsinformatiker (BA)

Grundschule: 1985 – 1989 in Hettingen
Realschule: 1989 – 1995 in Gammertingen,
abgeschlossen mit der Mittleren Reife am 11.07.1995
Gymnasium: 1995 – 1998 Berufliches Gymnasium der dreijährigen
Aufbauform, wirtschaftswissenschaftliche Richtung
Kaufmännische Schule Sigmaringen,
abgeschlossen mit der Allgemeinen Hochschulreife am
23.06.1998

Studium: 01.11.1998 - 16.02.2004 Studium der Tiermedizin an der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München
03.03.2004 Approbation als Tierärztin

Promotion: Seit 01.03.2004 Promotion am Institut für Tierzucht, Lehr-
stuhl für Tierzucht und Allgemeine Landwirtschaftslehre
unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Martin Förster,
Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität
München. Vom 01.04.2004 bis 31.12.2006 wissenschaft-
liche Mitarbeiterin am Institut für Tierzucht, Lehrstuhl für
Tierzucht und Allg. Landwirtschaftslehre

Berufl. Tätigkeit: Seit 01.01.2007 angestellte Assistenztierärztin in der
tierärztlichen Gemeinschaftspraxis Dr. M. Acktun und
T. Bergt, Nordhackstedt