

**Identifikation und Anwendung von genetischen Markern,
die beim Rind mit Trypanotoleranz gekoppelt sind**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Karin Rottengatter
aus Brelingen/Wedemark

Hamburg 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. Horstmann

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H.-P. Mühlbach

Tag der Disputation: 03. Mai 2002

Hamburg, den 23. April 2002



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	IV
Glossar	VII
1 Einleitung	1
1.1 Literaturübersicht.....	3
1.1.1 Trypanosomiasis	3
1.1.1.1 Trypanosomen	4
1.1.1.2 Krankheitsbild	6
1.1.1.3 Kontrollmethoden der Trypanosomiasis.....	7
1.1.2 Trypanotoleranz	8
1.1.2.1 Trypanotoleranz bei Wildtieren.....	9
1.1.2.2 Trypanotoleranz bei Rindern	10
1.1.3 Trypanotoleranzstudien mit Hilfe statistischer Analysen	11
1.1.3.1 Voraussetzungen zur Durchführung einer QTL-Analyse	12
1.1.4 Beschreibung des Rinderprojektes.....	22
1.1.5 Beschreibung des Mausmodells zur Trypanotoleranz	27
1.2 Zielsetzung der Arbeit	29
2 Material & Methoden	30
2.1 Material.....	30
2.1.1 DNA verschiedener Säugetiere.....	30
2.1.2 Chromosomensegmentspezifische DNA-Bibliothek	30
2.1.3 Somatische-Hybridzelllinien-DNA.....	31
2.1.4 Hybrid-Zelllinien mit radioaktiv bestrahlter Rinder-DNA	31
2.1.5 Klone künstlicher Bakterien-Chromosomen.....	32
2.1.6 DNA-Längenstandard	32
2.1.7 Oligonukleotide.....	32
2.1.7.1 Eingesetzte Oligonukleotidprimer	33
2.1.8 Computerprogramme für die statistische Datenanalyse.....	33
2.1.8.1 RHMAP Version 3.0	33
2.1.8.2 GeneHunter Version 2.0 beta.....	34
2.1.9 Reaktionssysteme (Analysekits)	35
2.1.10 Lösungen und Puffer	35
2.1.11 Nährmedien für Bakterienkulturen	36
2.1.12 Enzyme.....	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Vergleichendes Kartieren von Genen	38

2.2.1.1	Auswahl von Genen (Typ-I-Marker) und anonymen Markern (Typ-II-Marker) zur Kartierung.....	38
2.2.1.2	Kurzdarstellung der ausgewählten Kandidatengene	38
2.2.2	Erstellen rinderspezifischer Oligonukleotidprimer	43
2.2.2.1	Quantifizierung der Oligonukleotidprimer	44
2.2.2.2	Überprüfung der Spezifität der Oligonukleotidprimer.....	44
2.2.3	Standard-Polymeraseketten-Reaktion	44
2.2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten	45
2.2.3.2	Aufreinigung des PCR-Produktes.....	46
2.2.4	Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Produkten	46
2.2.4.1	Sequenzierreaktionen.....	47
2.2.4.2	Aufreinigung der Sequenzierreaktion	48
2.2.4.3	Sequenzvergleich und Homologieanalysen	48
2.2.4.4	Datenbanksuche.....	49
2.2.4.5	Sequenzstruktur- und Motivanalyse	49
2.2.4.6	Analyse des Informationsgehaltes von DNA-Sequenzen	49
2.2.5	PCR-Analysen der Hybrid-Zelllinien-DNA	49
2.2.6	Ligation und Transformation von PCR-Produkten aus der chromosomensegment-spezifischen Bibliothek	50
2.2.6.1	Glättung der PCR-Amplifikatenden und deren Ligation	50
2.2.6.2	Transformation von E.coli-Zellen.....	51
2.2.7	Statistische Analyse der Daten der Hybrid-Zelllinienkonstrukte	53
2.2.8	BAC-Bank-Sichtung und Weiterverarbeitung der erhaltenen BAC-Klone	54
2.2.9	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	55
2.2.10	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analysen von PCR-Produkten.....	56
2.2.11	Fragmentlängenbestimmung von Mikrosatelliten-Allelen	57
2.2.12	Kopplungsanalyse	58
3	Ergebnisse	60
3.1	Auswahl der Marker und Gene	60
3.1.1	Identifikation anonymer Marker	60
3.1.2	Identifikation von Typ-I-Markern.....	61
3.1.2.1	Kartierung der Marker mit Hilfe somatischer Hybridzelllinien-DNA.....	64
3.2	Kartierung der Gene und Mikrosatelliten mittels BovRH5- und BovRH12-Panel-DNA	65
3.2.1	Identifikation von Kopplungsgruppen der Marker	65
3.2.2	Anordnung der Loci	67
3.2.2.1	Retentionsmodell für die RH-Kartierung.....	67
3.2.2.2	Bestimmung der Locus-Anordnung im BovRH5-Panel	69
3.2.2.3	Bestimmung der Locus-Anordnung im BovRH12-Panel	73
3.3	Vergleichende Kartierung.....	77
3.4	Zytogenetische Kartierung der Gene PTPRB, VDR, PRKAG1 und CCNT1..	78
3.5	Polymorphismen.....	79

3.5.1	Identifizierung von Polymorphismen.....	79
3.5.1.1	Genfragmente	80
3.5.1.2	STS-Marker	82
3.6	Anwendung polymorpher Sequenzen	83
3.6.1	Beurteilung der Informativität der SNPs	83
3.6.2	Genotypenbestimmung für informative SNPs und Mikrosatelliten in den Rinderfamilien	84
3.6.2.1	Informativität der für die Genotypisierung benutzten SNPs und Mikrosatelliten in der F ₂ -Generation.....	86
3.6.3	Trypanotoleranz-QTL-Neukartierung auf dem Chromosom <i>BTA5</i>	87
4	Diskussion.....	90
5	Zusammenfassung	105
6	Literatur	107
7	Anhang.....	123
7.1	DNA, Kits, Enzyme, Chemikalien, Geräte und Computerprogramme	123
7.1.1	DNA	123
7.1.2	Oligonukleotide.....	123
7.1.3	Reaktionssysteme (Analysekits)	123
7.1.4	Enzyme.....	123
7.1.5	Chemikalien	124
7.1.6	Geräte	124
7.1.7	spezielle Computerprogramme	125
7.1.8	Internetseiten	125
7.2	PCR-Bedingungen der Typ-I- und Typ-II-Marker, sowie der STS-Marker .	125
7.3	Nukleotidsequenzen der Gen- und STS-Marker.....	128
7.3.1	Genfragmente.....	128
7.3.2	STS-Marker.....	132
7.4	Abkürzungen und genauere Beschreibungen der Phänotypen	134
7.4.1	Phänotypen, die Trypanotoleranz nicht direkt beschreiben	134
7.4.2	Phänotypen, die die Trypanotoleranz beschreiben	134

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A/J	spezieller Maus-Inzuchtstamm
ad	auffüllen auf
AG	Arbeitsgruppe
AIL	<i>advanced intercross lines</i> : fortgeschrittene Inzucht-Mauslinien
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
B.	<i>Bos</i> (Gattungsname)
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> : künstliches Bakterienchromosom
Balb/c	spezieller Maus-Inzuchtstamm
BC	<i>backcross</i> : Rückkreuzung
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i> : Sequenzvergleichprogramm der NCBI Datenbank
BNI	Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin
BovRH	bovines Radiation Hybrid-Zelllinienkonstrukt
bp	Basenpaare
BTA	<i>Bos taurus</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C57Bl/6	spezieller Maus-Inzuchtstamm
cDNA	zu einer RNA komplementäre DNA
Cen	Zentromer
CGIAR	Consultative Group on International Agricultural Research
CI	<i>confidence interval</i> : Vertrauensintervall
cM	centiMorgan
cR	centiRad
d.h.	das heisst
dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dNTP, dUTP	desoxy-Nukleotide (A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin, N=A/C/G oder T, U=Uracil)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDT	1,1-Dichlordiphenyl-2,2,2-Trichlorethan, Insektizid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> : Desoxyribonukleinsäure
DOP	degenerierter Oligonukleotidprimer
EDTA	Ethylen-Dinitrilotetraessigsäure
estMb	<i>estimated megabasepairs</i> : geschätzte Megabasenpaare
EST	<i>expressed sequence tag</i> : kurze cDNA-Sequenz, die mit PCR amplifizierbar ist
et al.	<i>et alii</i> : und andere
etc.	<i>et cetera</i> : und so weiter
F ₂ -, F ₁ -, F ₀ -	Filialgeneration 2, Filialgeneration 1, Filialgeneration 0 (Gründerpopulation)
FAM	Caroxyfluoreszein
FISH	<i>fluorescent insitu hybridisation</i> : Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
fo	<i>forward</i> : Vorwärts-Primer
g	Gramm oder Erdbeschleunigung, je nach Zusammenhang
H ₂ O	Wasser
HSA	<i>Homo Sapiens</i>
I	Intervall
ILRI	International Livestock Research Institute
IPTG	Isopropylthio-β-Galaktosid

ISCS	<i>interval specific congenic strain</i> : intervallspezifische kongene Maus-Inzuchtlinie
kb	Kilobasen
KG	Kopplungsgruppe
L	Liter
LB	Luria Bertani
ln	natürlicher Logarithmus
µl	Mikroliter
M	Morgan oder Mol, je nach Zusammenhang
MARC	U.S. Meat Animal Research Center
MAS	<i>marker assisted selection</i> , markergestützte Selektion
max.	maximal
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
<i>MMU</i>	<i>Mus Musculus</i>
MOET	<i>multiple ovulation and embryo transfer</i> : Verfahren in der Tierzucht, welches bei langtragenden Zuchttieren zur Erhöhung der Nachkommenzahl eingesetzt wird
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nest	<i>nested</i> : innerer Primer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomolar
NPAR	nichtparametrische (verteilungsunabhängige) Analysemethode
o.a.	oder andere
OD ₂₆₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> : Polymerasekettenreaktion
pers.	persönlich
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
pmol	Pikomolar
pter	<i>petit telomer</i> : den gesamten kurzen Arm (vom Zentromer bis zum Telomer) des Chromosoms betreffend
q-Bande	Quinacrin-gefärbte Bande eines Metaphasechromosoms
qter	<i>queue telomer</i> : den gesamten langen Arm (vom Zentromer bis zum Telomer) des Chromosoms betreffend
QTL	<i>quantitative trait loci</i> : den Merkmalkomplex beeinflussende Loci
r	Korrelationskoeffizient
Rad	<i>Radiation absorbed dose</i> : frühere Einheit der Energiedosis
re	<i>reverse</i> : rückwärts-Primer
ATP	Adenosintriphosphat
RF	<i>retention frequency</i> : Retentionsfrequenz
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> : Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RH-Panel	<i>radiation hybrid panel</i> : Siehe Glossar!
RNA	<i>ribonucleic acid</i> : Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> : Umdrehungen pro Minute

SCH-Panel	<i>somatic cell hybrid panel</i> : somatisches Hybrid-Zelllinienkonstrukt
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> : Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i> : Einzelnukleotidaustausch
sp.	<i>species</i> : einer Gattung angehörige, jedoch nicht auf die Art bestimmte Spezies
STS	<i>sequence tagged site</i> : sequenzmarkierende Stelle
<i>t.</i>	<i>taurus</i> (Artnamen)
Tab.	Tabelle
Ter	Telomer
TET	Tetrachlorfluoreszein
U	<i>unit</i> : Enzimeinheit
UV-Licht	ultraviolettes Licht
w/v	<i>weight/volume</i> : Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel
Zoo-FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung, die vergleichend an Chromosomen zweier (oder mehr) verschiedener Spezies durchgeführt wird

Glossar

CentiRad:

Kartierungseinheit bei Genkarten, die aus RH-Panelen erstellt sind. Die Einheit ist abhängig von der eingesetzten Bestrahlungsintensität. Eine Distanz von $1cR_{5000}$ repräsentiert 1% Bruchfrequenz zwischen zwei Markern, nachdem diese einer Energiedosis von 5000 Rad ausgesetzt waren.

Im Vergleich dazu sind *CentiMorgan* Kartierungseinheiten bei Kopplungskarten. Ein cM entspricht einer Rekombination von 1% als Ergebnis eines Cross-Overs zwischen zwei Markern auf homologen Chromosomen.

Kandidatengen:

Als Kandidatengen kann jedes Gen bezeichnet werden, welches aus bestimmten Gründen (z.B.: Funktion, Expressionsmuster, chromosomale Lokalisation, strukturelles Motiv) einen Einfluss auf eine bekannte Erkrankung haben kann und so als Locus für die Erkrankung in Erwägung gezogen werden kann.

Kopplung:

Als Kopplung wird die gemeinsame Vererbung von Genen oder Markern an einem Locus aufgrund ihrer physikalischen Nachbarschaft auf dem Chromosom bezeichnet.

Locus:

Eine bestimmte Chromosomenposition, die den Ort eines Gens oder Markers definiert, wird als Locus bezeichnet.

Lodscore:

Ein Maß für die Wahrscheinlichkeit einer genetischen Kopplung zwischen zwei Loci. Ist der Wert größer als +3, wird das oft als Kopplung interpretiert. Ein Wert unter -2 gilt meist als Beleg dafür, daß die beiden Loci nicht gekoppelt sind.

Marker:

Die heute verwendeten Marker sind vorwiegend Micro-, Minisatelliten (VNTR) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) und weisen meist sehr viele Allele auf, man bezeichnet sie dann als polymorph. Liegen sie im nicht codierenden Bereich, werden sie Typ-II-Marker, liegen sie im codierenden Bereich, werden sie Typ-I-Marker genannt. Anhand von polymorphen Markern lässt sich die Mendel'sche Weitergabe (Segregation) von Genen besonders gut beobachten, die Markergene eines Nachkommen lassen sich dann meist zweifelsfrei den jeweiligen Eltern zuordnen.

QTL:

Quantitative Trait Locus. Ein QTL bezeichnet einen Ort (Locus) auf der DNA, der einen messbaren Einfluss auf die Ausprägung eines Merkmals ausübt. Weil grundlegendes Wissen zum Erbgang fehlt, wird die Vererbung der Merkmale summarisch (quantitativ) zu erfassen versucht. Man nimmt dafür eine unendliche Anzahl unabhängiger Loci an, die für das betreffende Merkmal segregieren. Jeder dieser Loci hat einen unendlich kleinen Effekt auf die Ausprägung des Merkmals.

RH-Panel:

Radiation Hybrid Panel. Durch radioaktive Strahlung werden Chromosomenfragmente einer Zelllinie einer Spezies erzeugt, die von einer Zelllinie einer anderen Spezies in ihr Genom integriert werden. Die Anordnung von mit PCR amplifizierbaren DNA-Sequenzen kann mit Hilfe der RH-Panels bestimmt werden.

SCH-Panel:

Somatic Cell Hybrid Panel. Eine Zelllinie einer Spezies, die größere Chromosomenanteile einer anderen Spezies stabil aufgenommen hat. Mit Hilfe der SCH-Panels lassen sich mit PCR amplifizierbare DNA-Sequenzen einem Chromosom zuordnen.

STS-Marker:

Sequence Tagged Site. Sequenzmarkierende Stellen, die mit einer PCR-Reaktion amplifizierbar sind. STS-Marker sind in der Regel nicht polymorph.

Syntänie:

Der Begriff *Syntänie* bezieht sich auf das gemeinsame Auftreten von Genen auf gleichen Chromosomen, unabhängig davon, ob die Gene miteinander gekoppelt sind. *Konservierte Syntänie* beschreibt die gemeinsame Lage von Segmenten, bestehend aus zwei oder mehr homologen Genen, die bei zwei oder mehr Spezies jeweils auf einem Chromosom lokalisiert sind. Die Reihenfolge der Gene ist auch für die konservierten Syntänie ohne Bedeutung.

1 Einleitung

Die Anwendung moderner Verfahren der genetischen Analyse sind bei der Zucht von Nutztieren von erheblicher Bedeutung (Bovenhuis, 1997; Schwerin und Kühn, 1999).

Ein Gen, von dem angenommen wird, dass es funktionell mit einem Merkmal im Zusammenhang steht, wird als Kandidatengen bezeichnet (Kinghorn, 2000). Sequenzvarianten des Kandidatengens zeigen dann direkte Auswirkungen auf den Phänotyp (Baumung, 2001). Ein Beispiel ist das „Doppellender-Gen“, das beim Rind zu Muskelhypertrophie führt, wenn eine bestimmte Genvariante vorliegt (Dickmann, 1997). Bisher sind jedoch nur wenige solcher direkten Marker für wirtschaftlich bedeutende Merkmale bekannt.

Demgegenüber dient der Markergenansatz dazu, Markerloci, d.h. indirekte Marker, zu identifizieren, die innerhalb einer Population an merkmalsbeeinflussende Loci, sogenannte *quantitativ trait loci* (QTL), gekoppelt sind. Mit Hilfe von Markergenen können dann anhand der Kosegregation des Phänotypes mit den Markern QTL-Regionen identifiziert werden. Ohne dass die QTL-Allele bekannt sein müssen, können sie durch die mit ihnen gekoppelten Marker in einer Population durch gezielte Zucht angereichert oder herausgekreuzt werden (Georges et al., 1995). Eine Vielzahl von QTL, die für die Nutztierzucht interessant sind, wie die Leistungsmerkmale Milch-, Fett- und Eiweissmenge, aber auch Wachstum und Zwillingsgeburten (Andersson et al., 1994; Coppieters et al., 1998; Georges et al., 1995; Lien et al., 2000; Malek et al., 2001; Baumung, 2001) wurden bereits identifiziert, ohne dass alle beteiligten merkmalsbeeinflussenden Gene bekannt sind.

Die hier vorliegende Arbeit basiert auf einer vorangegangenen QTL-Analyse von Hanotte und Korol (nicht publiziert) zur Lokalisierung von Genen, die die Empfänglichkeit afrikanischer Rinder für die Nagana-Krankheit (Trypanosomiasis) beeinflussen. Rinder einiger Rassen, wie z.B. die N'Dama (*Bos taurus*), verhalten sich der Infektion mit Trypanosomen gegenüber tolerant, d.h. sie können die das Krankheitsbild bestimmenden Merkmale Parasitämie, Anämie und Gewichtsverlust kontrollieren (Murray et al., 1990; Kemp und Teale, 1998; Teale, ILRAD-Report, 1991). Dieser Phänotyp wird als Trypanotoleranz bezeichnet. Die QTL-Analyse von Hanotte und Korol wurde an einer F₂-Rinderpopulation durchgeführt, in der das Merkmal Trypanotoleranz segregiert, und ergab Hinweise für Kopplung auf Chromosom 5 (*BTA5*). Diese QTL-Region besteht aus zwei benachbarten Bereichen, die zusammen etwa 70cM groß sind (Hanotte, pers. Mitteilung).

Im Vergleich zu den Genomen von Mensch und Maus befindet sich die Kartierung des Rindergenoms erst in den Anfängen. Da aber Abschnitte von Chromosomen zwischen Säugetieren verschiedener Gattungen konserviert sein können, lassen sich ausgehend von den Genkarten von Mensch und Maus oft Rückschlüsse auf Lage und Anordnung der Gene bei anderen, weniger gut untersuchten Spezies ziehen (Wienberg und Stanyon, 1997; Womack

und Kata, 1995). Das Chromosom *BTA5* scheint weitgehend konserviert zum menschlichen Chromosom *HSA12*, sowie zu Bereichen der murinen Chromosomen *MMU6*, *MMU10* und *MMU15* (Chowdhary et al., 1996; Solinas-Toldo et al., 1995, Band et al., 2000). Daher ist vergleichendes Kartieren mit den detaillierteren Genkarten von Mensch und Maus möglich und führt zu einer feiner strukturierten Genkarte beim Rind.

Um die bekannte QTL-Region einzuengen, werden DNA-Sequenzvarianten in Genen, sogenannte Typ-I-Marker, und Typ-II-Marker, d.h. Mikrosatelliten oder andere anonyme Marker, benötigt.

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist die Erstellung einer detaillierten Genkarte der QTL-Region für Trypanotoleranz auf *BTA5*. Die Entwicklung neuer Typ-I-Marker erfolgte dabei über die vergleichende Genomanalyse. Die Kartierung ermöglichte das Auffinden neuer Kandidatengene für Trypanotoleranz. Typ-II-Marker wurden aus DNA-Bibliotheken isoliert, die durch Mikrosektion von Chromosom *BTA5* hergestellt wurden und daher spezifisch für *BTA5* sind.

Segregationsanalysen der neuen Marker in der oben genannten F₂-Rinderpopulation sollten das Ergebnis der ersten QTL-Analyse bestätigen und zur weiteren Eingrenzung der QTL-Region führen.

1.1 Literaturübersicht

1.1.1 Trypanosomiasis

In vielen tropischen und subtropischen Teilen der Welt sind die Trypanosomiasen eine weit verbreitete Bedrohung für Haus- und Nutztiere (Touratier, 2000). Die Trypanosomiasen lassen sich in die südamerikanischen Formen (Chagas-Krankheit) und die afrikanischen Formen (Schlafkrankheit) unterscheiden.

Allen Formen gemein ist die Infektion durch parasitische Protozoen, den Trypanosomen. Die einzelligen Trypanosomen werden typischerweise auf Haus- und Nutztiere, auf Wildtiere, aber auch auf Menschen übertragen.

Im tropischen Afrika ist die Trypanosomiasis die bedeutendste Viehkrankheit und wird beim Rind Nagana-Krankheit genannt. Sie tritt auf einer Fläche von 10 Millionen km² auf und betrifft 36 Länder des Kontinents (ILRAD, Annual Report 1991). Die Tsetse-Fliege (Gattung *Glossina*) ist in Afrika der Vektor der dort häufigsten Trypanosomenspezies. Sie überträgt vier Spezies (*Trypanosoma brucei*, *T. congolense*, *T. simiae* und *T. vivax*), die eine ernsthafte Erkrankung bei Rindern, Schafen, Ziegen, Schweinen, Pferden und anderen Nutztieren hervorrufen. *T. brucei* umfasst neben der tierpathogenen Form *T. brucei brucei* zwei menschenpathogene Trypanosomenformen: *Trypanosoma b. rhodesiense* und *T. b. gambiense*.

Außerhalb Afrikas sind andere Trypanosomenspezies bedeutend. Diese werden über Fliegen der Gattung Tabanidae und Wanzen der Gattung Triatominae übertragen (*non-tsetse-transmitted* Trypanosomiasis). In Tabelle 1.1 sind die medizinisch wichtigsten Trypanosomenarten von Mensch und Nutztier, ihre Vektoren und Verbreitungsgebiete aufgeführt.

Tabelle 1-1:

Darstellung der wichtigsten Trypanosomenarten, ihre Vektoren und ihre Verbreitungsgebiete

Trypanosomenart	Vektor	Verbreitungsgebiete
<i>Trypanosoma brucei</i> Gruppe	<i>Glossina sp.</i>	Afrika
<i>T. congolense</i> , <i>T. simiae</i> , <i>T. vivax</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrika
<i>T. cruzi</i>	<i>Tabanidae sp.</i> <i>Triatominae sp.</i>	Mittel- und Südamerika
<i>T. evansi</i>	<i>Tabanidae sp.</i>	Afrika, Asien, sowie Mittel- und Südamerika

Die Trypanosomenspezies, die die Erkrankung bei Mensch und Nutztier hervorrufen, infizieren auch Wildtiere. Viele der Wildtiere tolerieren die Infektion mit Trypanosomen ohne erkennbare Krankheitszeichen (Murray et al., 1982; Grootenhuis et al., 1990). Bei Mensch und Haus- bzw. Nutztier sind dagegen die pathogenen Effekte der Infektion schwer (Grootenhuis et al., 1990). Zur Zeit sind dem letzten WHO-Bericht zufolge allein in Afrika 60 Millionen Menschen der Gefahr der Erkrankung an der humanpathogenen Form ausgesetzt (Ferriman, 2001; Gastellu Etchegorry et al., 2001). Etwa 80% des Nutzviehbestandes Afrikas ist infiziert. 160 Millionen Rinder werden von der Krankheit bedroht (ILRAD, Annual Report 1991). In den letzten Jahren wurden neue Ausbrüche der Krankheit beobachtet (Fevre et al., 2001).

Große Gebiete Afrikas sind durch das Vorkommen von Trypanosomen und der Tsetse-Fliege von der Viehhaltung und dem Ackerbau ausgeschlossen. Die Bedeutung der Trypanosomiasis nimmt zu, da es die agrarwirtschaftlich bedeutenden Gebiete sind, die durch die Gefahr der Infektion mit Trypanosomen nicht nutzbar sind (d'Ieteren et al., 1998).

1.1.1.1 Trypanosomen

Stamm: Sarcomastigophora, Klasse: Zoomastigophora, Ordnung: Kinetoplastida (Wehner und Gehring, 1995)

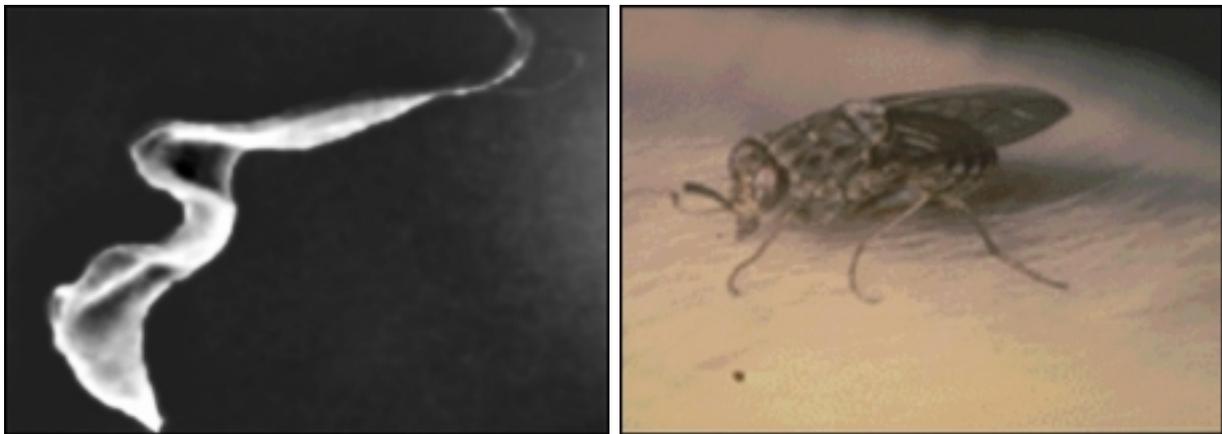


Abbildung 1-1

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *Trypanosoma sp.*, sowie fotografische Aufnahme des afrikanischen Vektors, *Glossina sp.* (Quelle: ILRI)

Der Lebenszyklus der afrikanischen Trypanosomen ist komplex (Barry und Vickermann, 1979) und beinhaltet einen obligaten Wirtswechsel, der hier am Beispiel von *T. brucei* dargestellt wird:

Der Kreislauf beginnt, wenn Trypanosomen bei der Blutmahlzeit der Tsetse-Fliege in den Wirt gelangen. Im Wirt vermehren sich die schlanken Formen (*slender forms*) des Parasiten durch Längsteilung. Aus den schlanken Formen entwickeln sich über eine intermediäre Zwischenform die stumpfbartigen Formen (*stumpy forms*), die in der Lage sind, Tsetse-Fliegen zu infizieren.

Aus der stumpfbartigen Form entwickelt sich im Darm der Tsetse-Fliege die prozyklische Form. Wiederum teilen sich die Parasiten mehrfach, wandern dann in den Proventrikulus und weiter in die Speicheldrüse der Tsetse-Fliege. Dort wechseln die Parasiten von der stumpfbartigen in die epimastigote Form und teilen sich weiter. Aus der epimastigoten Form entsteht in der Speicheldrüse schließlich die metazyklische Form, die bei einer Blutmahlzeit der Tsetse-Fliege an einen Säuger weitergegeben werden kann. Die metazyklische Form ist die infektiöse Form für Säugetiere. Aus ihr entwickelt sich dann im Säugerblut wieder die schlanke Form.

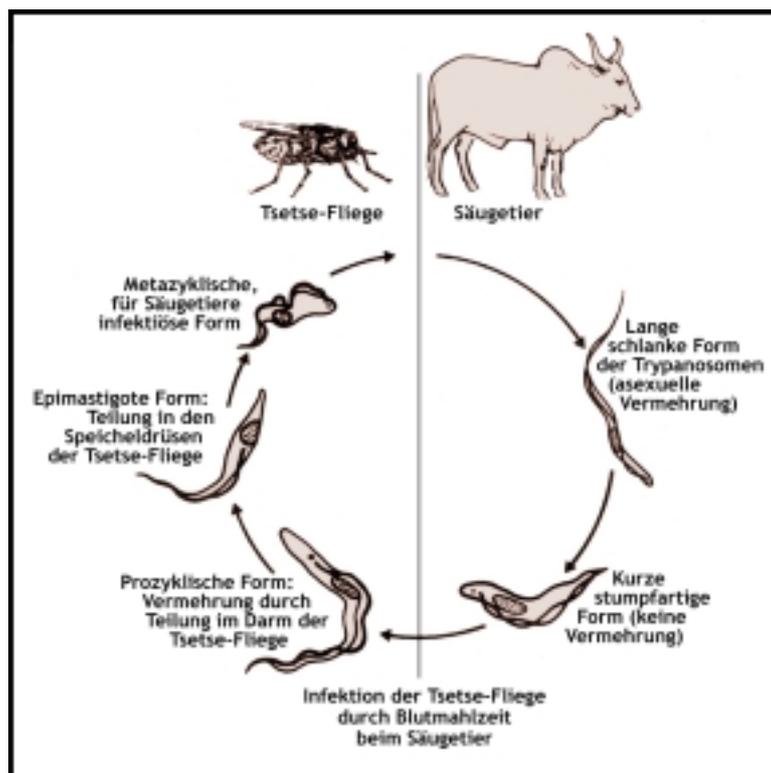


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *T. brucei*. (Quelle: ILRI)
Trypanosomen werden bei der Blutmahlzeit der Tsetse-Fliege auf den Wirt übertragen. Nach Vermehrung und Differenzierung der im Blut lebenden Form kann diese Tsetse-Fliegen bei Blutmahlzeiten infizieren. Weitere Differenzierungsschritte der Trypanosomen erfolgen im Darm, dem Proventrikulus und der Speicheldrüse der Tsetse-Fliege. In der Speicheldrüse entsteht die metazyklische, für den Säuger infektiöse Form.

In Tabelle 1-2 werden die häufigsten afrikanischen Trypanosomenarten und einige ihrer Wirte dargestellt.

Tabelle 1-2:

Darstellung der häufigsten afrikanischen Trypanosomenarten, ihre wichtigsten Wirte und ihre Wirtspathogenität

Trypanosomenart	Wirt	Humanpathogen	Tierpathogen
<i>T. b. gambiense</i>	Anthropoidae	ja	nein
<i>T. b. rhodiense</i>	Anthropoidae, Bovidae, Suidae, Equidae	ja	nein
<i>T. b. brucei</i>	Bovidae, Suidae, Equidae	nein	ja
<i>T. congolense</i>	Bovidae, Suidae, Equidae	nein	ja
<i>T. vivax</i>	Bovidae, Suidae, Equidae	nein	ja
<i>T. simiae</i>	Bovidae, Suidae, Equidae	nein	ja

1.1.1.2 Krankheitsbild

Die verschiedenen Trypanosomenspezies rufen im Wirt unterschiedliche Reaktionen hervor. Da simultan auftretende Infektionen mit mehr als einer Trypanosomenspezies, aber auch mit anderen Blutparasiten üblich sind (Nyeko et al., 1990), ist es schwierig, ein „typisches“ Krankheitsbild zu definieren (Losos und Chouinard, 1979):

Das Hauptanzeichen der Nagana-Krankheit beim Rind ist die Anämie. Diese wird von den im Blut lebenden Parasiten, z.B. *T. congolense*, *T. vivax* und *T. b. brucei*, verursacht und geht im Frühstadium der Krankheit mit Leuko- und Thrombopenie einher: Innerhalb einer Woche nach der Infektion findet ein deutlicher Abfall der Anzahl der roten und weissen Blutkörperchen, des Hämatokrits (PCV) und des Hämoglobingehaltes statt. Diese Werte sinken innerhalb von etwa 2 Monaten auf unter 50% ihrer Normalwerte. Weitere immer mit der Krankheit einhergehende Anzeichen sind periodisches Fieber, Ödeme und Verschlechterung der Konstitution. Fehlgeburten und Unfruchtbarkeit bei beiden Geschlechtern sind die Folge. Im Endstadium verursachen die Erreger fokale Enzephalomalazie, verursacht wahrscheinlich durch Akkumulation von Parasiten in den Gehirngefäßen. Die erkrankten Tiere sind stark geschwächt, nicht mehr in der Lage, Bewegungen zu koordinieren, und sterben schließlich.

T. vivax ist in Rindern weniger virulent als *T. congolense*, verursacht aber eine Mortalitätsrate von über 50%.

Die Schädigungen des Wirtes durch *T. b. brucei* oder *T. b. rhodiense* unterscheiden sich stark von denen anderer Trypanosomen. *T. b. brucei* z.B. hat eine sehr kurze Inkubationszeit und verursacht bei Rindern, Ziegen, Schafen (Bovidae) und Schweinen (Suidae) zunächst ein mild bis chronisch verlaufendes Krankheitsbild. Die Anämie ist zwar auch hier ein wichtiges Symptom, aber die entstehenden Entzündungen, Degenerationen und Nekrosen, verursacht durch die Invasion des Erregers in Organe, sind weitaus gefährlicher für den Wirt. Infizierte Tiere sterben innerhalb weniger Wochen bis mehrerer Monate, abhängig von der Virulenz des Erregerstammes.

Die Schwächung der Abwehrreaktion durch den Trypanosomeninfekt bewirkt, dass die Tiere auch anfälliger für andere, sonst nicht lebensbedrohende Erkrankungen sind. Sekundärinfekte führen zu einer Beschleunigung des Krankheitsverlaufes.

Der Schweregrad der klinischen Anzeichen ist abhängig von der Spezies des betroffenen Tieres sowie von Anzahl und Typ des Erregers. Stress durch z.B. Unterernährung und andere Krankheiten spielen ebenfalls eine wichtige Rolle im Krankheitsverlauf.

1.1.1.3 Kontrollmethoden der Trypanosomiasis

Verschiedene Methoden werden angewandt, um die afrikanische Trypanosomiasis zu bekämpfen oder einzudämmen:

- Medikamente zur Infektionsprophylaxe und zur Therapie erkrankter Menschen und Tiere sind im Einsatz (Gastellu Etchegorry et al., 2001).
- Die Reduktion der Tsetse-Fliegenpopulationen, die die Trypanosomen in Afrika verbreitet, ist eine wichtige Kontrollmöglichkeit (Ferriman, 2001).

1.1.1.3.1 Medikamente

Die Infektionsprophylaxe, bzw. die Therapie erkrankter Individuen dient auch der Reduktion der Anzahl an Erregerreservoirs. Sie ist die am häufigsten eingesetzte Methode, um die Verbreitung der Trypanosomiasis gering zu halten. Therapie und Prophylaxe basieren immer noch auf Medikamenten, die zum Teil schon vor 50 Jahren entwickelt wurden. Der Einsatz ist aufgrund hoher Reinfektionsraten, die wiederholte oder ununterbrochene Behandlung erfordern, wenig praktikabel. Der weitverbreitete Einsatz führte bei vielen Medikamenten zu Resistenzbildungen bei den Trypanosomen. Neue, verbesserte Medikamente kommen in absehbarer Zeit nicht auf den Markt (Anene et al., 2001; Keiser et al., 2001), da die großen Pharmafirmen die Forschung und Produktion trypanozider Medikamente aus Kostengründen

einstellen, bzw. wegen gesetzlicher Einschränkungen die Verarbeitung der stark arsenhaltigen Rohstoffe reduzieren müssen (Gastellu Etchegorry et al., 2001).

1.1.1.3.2 Vektorkontrolle

Trypanosomenverseuchte Gebiete wurden in den 80er Jahren massiv mit DDT-Pestiziden besprüht, um die Ausbreitung der Tsetse-Fliegen einzudämmen (Ferriman, 2001).

Anwendungen dieser Art sind ökologisch für Mensch und Umwelt nicht vertretbar und kommen heute nur noch in kleinen Arealen zum Einsatz, obwohl Tsetse-Fliegen suszeptibel gegenüber gängigen Insektiziden sind. Neben den ökologischen Nachteilen konnten Insektizide Reinvansionen der Tsetse-Fliege in den betroffenen Regionen nicht verhindern (Allsopp, 2001).

Ein verbreiteter Ansatz zur Vektorkontrolle ist der Einsatz von Fallen für Tsetse-Fliegen, die in deren Habitaten plaziert werden (Ferriman, 2001; Joja und Okoli, 2001). Da sich in den letzten Jahren die Konstruktionen der Fallen und deren Handhabung verbessert haben, konnten mit ihrer Hilfe die Fliegenpopulationen bereits verkleinert werden (Leygues und Gouteux, 1989).

Keine dieser beiden Methoden hat sich, ob einzeln oder kombiniert, als ideal erwiesen. Eine hohe Effektivität ist bisher immer mit hohen Kosten verbunden und für den einzelnen Farmer oft nicht tragbar.

Parallel zu den Kontrollmethoden wurde angefangen, vermehrt einheimische, die Krankheit tolerierende Tiere als Haus- und Nutztiere zu halten. Ziel ist es, Nutzvieh zu züchten, das wirtschaftlich produktiv und gleichzeitig widerstandsfähig gegen die Krankheit ist (McDermott und Coleman, 2001).

1.1.2 Trypanotoleranz

Die Fähigkeit, den pathogenen Effekten der Trypanosomeninfektion zu widerstehen, wird als Trypanotoleranz bezeichnet. Der Toleranzmechanismus einiger Säugetierordnungen gegenüber Trypanosomeninfektionen hat sich über einen langen Zeitraum entwickelt: Wilde Bovidae, die eine hohe Toleranz gegenüber der Infektion mit Trypanosomen zeigen (Murray et al., 1982), traten in Afrika schon vor 20 - 40 Millionen Jahren auf (Leakey und Lewin, 1977).

Die Trypanotoleranz ist nicht absolut und wird durch mehrere Faktoren beeinflusst: Neben der Rassenzugehörigkeit und dem Zuchtreinheitsgrad des Viehs, dem Ernährungszustand, der

Arbeitslast und dem Geschlecht, spielen auch der Grad der Belastung durch Trypanosomen und Umweltfaktoren eine große Rolle (Teale, 1999).

Der Einsatz und die Zucht von einheimischem Viehrassen, die die auf genetischer Basis beruhende Fähigkeit haben, eine Infektion mit Trypanosomen zu tolerieren und gleichzeitig wirtschaftlich produktiv sind, dürften die auf Dauer effektivste Methode der Bekämpfung der Krankheit beim Nutzvieh sein (Teale, 1999).

1.1.2.1 Trypanotoleranz bei Wildtieren

Wildtiere leben relativ unbeschadet in stark mit Tsetse-Fliegen und Trypanosomen belasteten Regionen. Frühe Studien zeigten, dass mit Trypanosomen befallene Tiere – unabhängig von der Erregerart *T. brucei*, *T. vivax* oder *T. congolense* – häufig Ruminantia und unter ihnen die Stirnwaffenträger (Pecora) sind. Dreissig bis 50% der Tiere sind mit einer Erregerart oder mehreren Erregerarten infiziert. Die Rappenantilope [*Hippotragus niger*], die Thomson-Gazelle [*Gazella thomsoni*] und das Weissbartgnu [*Connochaetes t. albojubatus*] gelten als weitgehend erregerfreie Artiodactyla. Beim Zebra [*Equus burchelli*] und dem Rhinoceros [*Diceros bicornis*] als Vertreter der Perissodactyla sind sehr wenige Parasiten gefunden worden (Ashcroft, 1958; Drager und Mehlitz, 1978; Dillmann und Townsend, 1979; Mattioli et al., 1990).

Bemerkenswert ist die Resistenz gegen die pathogenen Effekte der Trypanosomen bei Kaffernbüffeln [*Syncerus caffer*] (Ashcroft, 1959, Ashcroft et al., 1959; Geigy et al., 1971; Rurangirwa et al., 1986; Mulla und Rickman, 1988; Reduth et al., 1994). Kaffernbüffel, die in Gefangenschaft aus trypanosomenfreien Eltern gezüchtet wurden, zeigten keinerlei Anzeichen einer Erkrankung, nachdem sie mit *T. brucei* (Reduth et al., 1994), mit *T. vivax* (Dwinger et al., 1986), *T. congolense* (Grootenhuis et al., 1990; Olubayo et al., 1990) oder mit Gemischen aus allen drei Erregern (Wang et al., 1999) infiziert wurden.

Trypanosomeninfektionen und die Erkrankung daran sind bei Säugetieren nicht nur in den Ordnungen Artio- und Perissodactyla bekannt. Auch z.B. Landraubtiere (Fissipedia) wie Löwen [*Panthera leo*], Leoparden [*Panthera pardus*] und Schakale [*Canis sp.*] etc. können infiziert sein (Baker, 1968; Dillmann und Townsend, 1979). Bei diversen Primaten wie Pavianen [*Papio sp.*] und einigen Meerkatzen [*Cercopithecus sp.*] sind Infektionen bekannt (Murray et al., 1982). Nur in wenigen Fällen zeigten infizierte Wildtiere die typischen Symptome einer Trypanosomiasis (Baker, 1968).

1.1.2.2 Trypanotoleranz bei Rindern

Vor 5000 bis 7000 Jahren zogen die taurinen Buckel-losen Hamitic Langhornrinder [*Bos taurus*] nach Afrika ein. Nach und nach wurden die Buckel-tragenden Rinder [*Bos indicus*] eingeführt, die heute in Ostafrika dominieren (Epstein, 1971). Generell lassen sich die Rinderpopulationen Afrikas in vier große Kategorien einordnen (Rege et al., 1999):

- Buckel-lose *Bos taurus* mit der angeborenen Fähigkeit, die Infektion mit Trypanosomen zu tolerieren,
- Buckel-tragende *Bos indicus* (Zebu), weit in Afrika verbreitet und stark anfällig für die Trypanosomiasis,
- Abkömmlinge von *B. taurus* und *B. indicus* Kreuzungen, sogenannte Sangas, die überwiegend in Ost- und Südafrika zu finden sind, sowie
- Abkömmlinge von Sanga und Zebu Kreuzungen, die auf Regionen in Äthiopien und Uganda beschränkt sind.

Die beiden letzteren Gruppen zeigen graduelle Toleranz gegenüber Trypanosomeninfektionen entsprechend ihres *Bos taurus*-Anteils.

Der taurine Rindertyp besteht aus zwei Untergruppen, den Langhorn-Rindern [*B. taurus longiformes*] und den Kurzhorn-Rindern [*B. t. brachyceros*]. Beide Rassen sind in West- und Zentralafrika zu finden. Die Langhorn-Rinder werden von den beiden Arten N'Dama und Kuri vertreten, während die Kurzhorn-Rinder aus diversen Arten bestehen (Rege et al., 1999).

In Regionen mit wenig oder keiner Trypanosomenbelastung, insbesondere in Ostafrika, kommen überwiegend Rinder vom Zebu-Typ, generell den *B. indicus* zugehörig, vor. In Zentral- und Westafrika, einer Region mit hohem Infektionsdruck durch Trypanosomen, findet man dagegen Rinder, die dem trypanotoleranten *B. taurus*-Typ angehören (Murray et al., 1990; Kemp und Teale, 1998).

Die kleinwüchsigen N'Dama (Langhorn-Rinderrasse) und Baoulé (Kurzhorn-Rinderrasse) sind die am besten beschriebenen trypanotoleranten Arten unter den Nutztieren (z.B. Trail et al., 1989; Murray et al., 1982; Murray und Black, 1985; Teale, ILRAD-Report 1991; Ali und deCastro, 1993). Sie zeigen die Toleranz besonders deutlich. Bei den trypanotoleranten westafrikanischen Kurzhornrindern variiert der Grad der Trypanotoleranz, insbesondere unter hohem Infektionsdruck (Roelants, 1986).

Obwohl trypanotolerante Rinderrassen in West- und Zentralafrika bekannt sind, sind sie nur zu einem äusserst geringen Anteil in der Gesamtpopulation und Zucht vertreten. Nur ca 5% der gesamten Rinderpopulation in Tsetse-belasteten Gebieten gehören diesen toleranten Rassen an. Einheimische Viehzüchter, Kleinbauern und Familien, die den hauptsächlichen Anteil der Tierhalter Afrikas ausmachen, sind aufgrund der geringen Größe und Produktivität wie Milch- und Fleischleistung der Tiere nicht an deren Haltung und Zucht interessiert (ILCA-Report, 1979; ILCA/ILRAD Kenia, 1986; ILCA/ILRAD Ethiopien, 1986).

Die ersten Stadien der Trypanosomeninfektion gleichen sich bei den toleranten und suszeptiblen Tieren in Bezug auf den Grad der Parasitämie (Black et al., 2001). Infizierte trypanotolerante Rinder entwickeln jedoch eine erheblich schwächere Anämie (Murray und Dexter, 1988), und die Intensität, Ausbreitung und Dauer der Parasitämie im Krankheitsverlauf ist geringer als bei den suszeptiblen Rindern (Dargie et al., 1979; Murray et al., 1982). Die Fähigkeit, die Parasitämie niedrig zu halten und der Anämie zu widerstehen, gelten als die wichtigsten Indikatoren für das Merkmal Trypanotoleranz.

1.1.2.2.1 Untersuchungen zur Trypanotoleranz bei Rindern

Es gibt nur wenige Studien über die Vererbung der Trypanotoleranz bei Rindern (Letenneur, 1978; Stewart, 1951; Chandler, 1952). Anfang der 90er Jahre wurden im ILRAD (International Laboratory for Research on Animal Diseases, jetzt ILRI) bei Rindern gezielt Untersuchungen zur Trypanotoleranz an Zwillingsstieren und an N'Dama-Boran-Chimären durchgeführt, die zu der Hypothese führten, dass Trypanotoleranz ein genetisch bedingtes Merkmal ist (Teale, 1993). Kreuzungsstudien mit N'Dama- (*Bos taurus*) und Zebu-Rindern (*Bos indicus*), sowie Kreuzungen zwischen den jeweils relativ reinrassigen N'Dama- und Jersey-Rindern ergaben hinsichtlich der Trypanotoleranz Ergebnisse, die auf einen intermediären, additiven Erbgang schließen ließen. Die großen Differenzen im Grad der Toleranz bei Kreuzungen der unterschiedlichen Rinderrassen zeigt deren Durchmischungsgrad von *Bos taurus*- und *Bos indicus*- Anteilen an.

1.1.3 Trypanotoleranzstudien mit Hilfe statistischer Analysen

Für die Züchtung auf maximale Trypanotoleranz werden Gruppen von Zuchttieren benötigt, deren Trypanotoleranzstatus – und somit der *Bos taurus*-Anteil - genauer bekannt ist (Murray et al., 1982). Der Phänotyp Trypanotoleranz muss anhand von messbaren Parametern in Zuchtpopulationen definiert und für die einzelnen Tiere bestimmt werden. Innerhalb der Zuchtpopulationen kann anhand der Betrachtung der Kosegregation von Phänotypen und

DNA-Markern die Vererbung der Trypanotoleranz verfolgt werden, ohne dabei die für die Toleranz verantwortlichen Gene kennen zu müssen. Voraussetzung für eine solche Analyse ist, dass die DNA-Marker erkennen lassen, welches ihrer Allele von welchem Elternteil ererbt wurde. Ein Verfahren dieser Art auf statistischer Basis wird QTL (*quantitativ trait loci*)-Analyse genannt. QTL-Analysen befassen sich mit der Vererbung von Merkmalen, von denen der exakte Erbgang, wie z.B. die Anzahl und Wirkung der beteiligten Loci und Allele, nicht genauer bekannt ist. Die betrachteten Merkmale können dabei kontinuierlich (quantitativ, z.B. Tageszunahmen, Größe) oder diskret (qualitative, z.B. Krankheiten) verteilt sein. Die Vererbung der Merkmale wird summarisch – quantitativ – in einem Merkmalkomplex zu erfassen versucht. In QTL-Analysen werden einem solchen Merkmalkomplex bestimmte Regionen im Genom zugeordnet, wobei die Genotypen der DNA-Marker der untersuchten Individuen einer Zuchtpopulation mit den Phänotypen der Individuen verglichen wird. Segregiert z.B. ein Genotyp eines DNA-Markers immer mit einem bestimmten Phänotyp, kann vermutet werden, dass die Region, in der dieser DNA-Marker liegt, auch das für den Phänotyp verantwortliche Gen, bzw. dessen Variante, enthält.

Eine Analyse auf diese Weise wurde 1988 von Soller und Beckmann für die Annäherung des Merkmalkomplexes Trypanotoleranz im Rindergenom vorgeschlagen: Eine sogenannte Genomanalyse mit DNA-Markern sollte dazu führen, die Regionen zu erkennen bzw. zu analysieren, in denen die für die Trypanotoleranz bzw. Trypanosuszeptibilität verantwortlichen Gene, bzw. deren Varianten, liegen.

1.1.3.1 Voraussetzungen zur Durchführung einer QTL-Analyse

Der erste Schritt einer solchen Analyse besteht darin, dass zwei Populationen gefunden werden müssen, die sich in dem zu untersuchenden Phänotyp deutlich unterscheiden. Je größer die Differenz im Phänotyp, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, einen oder mehrere QTL ermitteln zu können (Moore und Nagle, 2000). Die aus den beiden Populationen gezüchtete zweite Generation (F_1 -Generation) kann auf unterschiedliche Weise für die Zucht der F_2 -Generation herangezogen werden: Üblicherweise wird innerhalb der F_1 -Generation gekreuzt, um die F_2 -Population zu erhalten. Dieses Verfahren bietet sich an, wenn die Gründerpopulationen (F_0 -Generationen) den Phänotyp in unterschiedlich starker Ausprägung zeigen. Die F_1 -Generation sollte idealerweise einen intermediären Phänotyp zeigen, während der Phänotyp in der F_2 -Generation alle Abstufungen – eventuell sogar noch extremere Phänotypen als die F_0 -Generation – zeigt.

Handelt es sich bei dem zu untersuchenden Phänotyp um einen rezessiven Erbgang und ist eine der beiden Ausgangspopulationen negativ für diesen Phänotyp (z.B. bei Maus-Inzuchtstämmen), sind Rückkreuzungen der F_1 - mit der F_0 -Generation sinnvoll. Dadurch wird in der Rückkreuzungsgeneration BC (*backcross*) die Negativausprägung des gewünschten Merkmals gefestigt.

Die erforderliche Größe der F_2 -Population ist von mehreren Faktoren abhängig, die oft erst im Laufe der Analyse deutlich werden. Die phänotypische Varianz der F_2 -Generation (oder der BC-Generation), die Anzahl der gefundenen QTL, aber auch die Anzahl der eingesetzten DNA-Marker (Markerdichte) und deren Informativität in der Population, sowie Rekombinationshäufigkeiten haben deutlichen Einfluss auf das Ergebnis der QTL-Analyse. Darvasi und Soller (1997) stellten genaue Kalkulationsmöglichkeiten vor, um die erforderliche Größe einer Population für eine solche Analyse zu bestimmen.

Für die Analyse muss zunächst der Phänotyp von allen Tieren bestimmt werden. Von den Tieren der F_2 -Generation, die deutlich einen der beiden Phänotypen der F_0 -Generation zeigen, müssen die genetischen Marker untersucht werden, um eine Assoziation zwischen Phäno- und Genotyp herstellen zu können.

1.1.3.1.1 Identifizierung merkmalsassoziierter genetischer Varianten

Im Zusammenhang mit der Identifizierung der an der Merkmalsausprägung beteiligten genetischen Varianten kommen zwei Ansätze der genetischen Analyse zur Anwendung: der Marker- und der Kandidatengenansatz.

1.1.3.1.1.1 DNA-Marker und der Markeransatz

Als DNA-Marker werden Polymorphismen der Erbanlagen mit bisher unbekannter Funktion, aber bekannter Position auf den Chromosomen bezeichnet, die an Nachkommen weitervererbt werden und dabei ihre Position im Genom beibehalten. Durch ihre stabile Position markieren sie unbekannte merkmalsbeeinflussenden Genorte in ihrem Bereich indirekt mit und lassen deren Mitverfolgung beim Erbgang zu (Nicholas, 1996).

„Repetitive DNA“ stellt eine wesentliche Quelle genetischer Variation dar und eignet sich dadurch als genetischer Marker. Bestimmte Sequenzmotive, die „*tandem repeats*“, sind Wiederholungen einer Abfolge von zwei oder mehr Basen in der DNA. Unterschiede sowohl in der Länge der Sequenzmotive als auch in der Anzahl der Wiederholungen führten zu einer Einteilung in Makro-, Midi-, Mini- und Mikrosatelliten (Georges und Massey, 1991). Die Zahl der Wiederholungssequenzen innerhalb der Satellitenloci variiert so stark, dass diese als hochinformativ genetische Marker in der Nutztierzucht dienen (Schwerin, 1992).

Minisatelliten umfassen eine Motivlänge von 10-60 Basenpaaren (Jeffreys et al., 1985), während sich das Motiv der Mikrosatelliten über 1-5 Basenpaare erstreckt (Tautz, 1989). Richardson et al. (1986) stellten fest, dass ungefähr 30 % des bovinen Genoms aus repetitiven Elementen besteht.

Bei einem Markeransatz werden DNA-Marker zur QTL-Lokalisierung genutzt. Dazu sind neben dichten Markerkarten, d.h. verfügbaren genetischen Markern, die möglichst dicht das gesamte Genom abdecken (Barendse et al., 1997; Bishop et al., 1994; Ferretti et al., 1997), entsprechende informative Familien einer Population notwendig. In solchen Familien werden dann die Vererbung von Markern und Phänotyp analysiert. Kosegregation zweier Loci zeigt deren Kopplung an, und über die Weitergabe der Markerallele mit einem bestimmten Phänotyp werden Informationen über die Vererbung von QTL-Allelen erworben.

In der Tierzucht wird die Information, die über die Kopplung von genetischen Markern mit einem oder mehreren Merkmalen besteht, gezielt für Selektionsentscheidungen eingesetzt. Tiere mit dem gewünschten Marker-Genotyp können für die Zucht herangezogen werden, ohne dass auf die Ausprägung ihrer Leistungsmerkmale oder Phänotypen – oder der der Nachkommen – in dem Adultstadium gewartet werden muss (Dentine, 1999; Beck et al., 2000). Diese markergestützte Selektion (*marker assisted selection*, MAS) ist allerdings nur innerhalb von Familien möglich, und setzt Heterozygotie für die gekoppelten Marker- und QTL-Allele voraus (Weller et al., 1990). Nur so ist sichergestellt, dass Nachkommen mit einem bestimmtem Marker-Allel immer auch das damit gekoppelte QTL-Allel des Gründer-tieres tragen. Die alternativen Allele des QTL-Locus führen zur Ausprägung alternativer Phänotypen und somit zur Unterscheidung in der Nachkommenschaft.

1.1.3.1.1.2 Genkartierung

Seit DNA-Marker zur Verfügung stehen, die sich über das ganze Genom verteilen, sind Genkartierungen möglich geworden. Die Dichte der Marker ist mitentscheidend, will man Marker auf ihre Kopplung hin untersuchen. Eine Kopplung zwischen zwei Loci liegt vor, wenn die Rekombinationsrate zwischen den Loci kleiner als 0,5 (=50%) ist. Bei gekoppelten Loci werden sich bei der Bildung der Haplotypen während der Meiose ein höherer Anteil nicht-rekombinanter Haplotypen befinden. Kopplung zweier Loci bedeutet Kosegregation, d.h. die Allele an den betreffenden Loci werden nicht unabhängig voneinander an die nächste Generation vererbt. Die relative Distanz zwischen zwei Markern oder Loci auf dem Chromosom wird in centiMorgan angegeben. Ein centiMorgan (cM) entspricht 1% Rekombination zwischen zwei Markern oder Loci. Treten keine Rekombinationen zwischen zwei Loci auf, reichen zehn Meiosen (Strachan und Read, 1996), um eine Kopplung nachzuweisen. Bei einer

Rekombinationsrate von 0,3 benötigt man jedoch schon 85 Meiosen. Im Tiermodell erhält man die hohe Anzahl von Meiosen durch gezielte Zucht. Bei Mäusen, die eine kurze Reproduktionszeit haben, lassen sich leicht hunderte von F₂-Tieren aus einer geringen Anzahl von F₀- und F₁-Tieren züchten (z.B.: Uimari et al., 1996). Bei Zuchttieren mit weitaus längeren Tragezeiten wird auf Verfahren wie z.B. Embryonentransfer (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*, MOET) zurückgegriffen (Visscher et al., 2000; van Wagtenonk-de Leeuw et al., 2000; Gearheart et al., 1989).

Die ständig zunehmende Zahl an bekannten genetischen Markern bei den wichtigsten Zuchttierspezies erlaubt Kopplungsanalysen mit 200 bis 300 gut über das Genom verteilten informativen Markern in Familien. Trotzdem ist diese Markerdichte nicht als hoch anzusehen. Noch immer bestehen in einigen Genomregionen Intervalllängen von 20 bis 30cM ohne informative Marker (Coppieters et al., 1999). Je nach Spezies können diese Intervalle auch weitaus größer sein (Gibson, pers. Mitteilung, 1999).

1.1.3.1.1.3 Kandidatengenansatz

Kandidatengene sind Gene, die für wichtige Proteine der Merkmalsausprägung kodieren. Bei diesem Ansatz werden Prozesse analysiert, von denen man vermutet, dass sie in die Merkmalsausprägung involviert sind. Gene, die als mögliche Kandidatengene herangezogen werden, werden auf merkmalsassoziierte Varianten überprüft (Schwerin et al., 1995; Bovenhuis, 1999). Die Identifizierung der Genvarianten erfolgt in den meisten Fällen zunächst mittels einer spezifischen Vervielfältigung der Basensequenz (*polymerase chain reaction*, PCR) und des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP; Kehrlı et al., 1990; Dennis et al., 1989; Schwenger et al., 1993; Zhang et al., 1990; Ricketts et al., 1987; Inaba et al., 1996; Chen et al., 1995; Grobet et al., 1997; Joerg et al., 1996; Medrano, 1990). Wird nur noch ein Gen als Kandidat in Betracht gezogen, dient die Sequenzierung zur Identifikation der Genvarianten.

Man kann zwischen funktionellen und positionellen Kandidatengenen unterscheiden. Während es sich bei den positionellen Kandidatengenen um Gene handelt, die sich im Bereich kartierter QTL befinden, stellen funktionelle Kandidatengene solche Gene dar, von denen angenommen wird, dass ihre Produkte an der Merkmalsausprägung beteiligt sind.

Funktionelle Kandidatengene

Funktionelle Kandidatengene sind Gene, deren Genprodukte mit Prozessen z.B. einer Krankheitsresistenz in Zusammenhang gebracht werden können.

Die erfolgreiche Bestätigung eines Kandidatengens ist leichter, wenn neben der funktionellen Bedeutung eine positionelle hinzukommt (Strachan und Read, 1996). Dryja et al. (1990) nahmen Rhodopsin sowohl aus funktionellen, als auch aus positionellen Gründen als Kandidatengen für die Erkrankung Retinitis Pigmentosa an und konnten innerhalb eines Jahres patienten-spezifische Mutationen in diesem Gen finden. Dietz et al. (1991) und Putnam et al. (1995) zeigten, dass in der Familie der Fibrillin-Gene Mutationen in den verschiedenen Genen ähnliche Krankheitsbilder hervorrufen (Marfan Syndrom und Beals-Hecht-Syndrom). Putnam et al. (1995) schlossen durch Vergleichen der Krankheitsbilder auf die an der Krankheit beteiligte Genfamilie.

Positionelle Kandidatengene

Voraussetzung für die Identifizierung eines positionellen Kandidatengens ist dessen Lage im Genom. Im Bereich errechneter QTL-Regionen beim Nutztier können durch die Erstellung integrierter Genkarten (kombinierte Genkarten aus genetischen und physikalischen Genkarten) Gene identifiziert werden, die in diesem QTL-Bereich lokalisiert sind und aufgrund ihrer Position Kandidatengene für das mit dem entsprechenden QTL beschriebene Merkmal sind. Der positionelle Kandidatengenansatz führte u.a. zur Entdeckung des „Muskelhypertrophie-Gens“ (Myostatin) als Ursache für das Merkmal „Doppellender“ bei Rindern der Rassen 'Weissblaue Belgier' sowie 'Piemontese' (Grobet et al., 1997). 1995 wurde von Georges et al. der entsprechende QTL auf *BTA2* (*Bos taurus* Chromosom 2) kartiert. Informationen aus der physikalischen Genkarte des Menschen halfen, Kandidatengene im zum *BTA2* homologen Chromosomenbereich *HSA2* (*Homo sapiens* Chromosom 2) zu identifizieren. Die Position des Myostatingens der humanen Genkarte stimmte mit dem „Muskelhypertrophie-Gen“ der bovinen Genkarte überein. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine inaktivierende Mutation im Gen dazu führt, dass das Protein das normale Muskelwachstum nicht mehr einschränken kann (Dickmann, 1997).

Positionsklonierungen von Genen (*positional candidate cloning*) sind erst durch die fortschreitenden Genomanalysen bei Mensch, Maus und Nutztier möglich geworden. Das vergleichende Positionsklonieren erfordert möglichst genaue Informationen zur Genanordnung

bei der Nutztierspezies selbst, aber auch genaue Angaben zu Regionen konservierter Syntänie zwischen den besser untersuchten Spezies Mensch und Maus zu den entsprechenden Regionen bei den Nutztierspezies. Als konservierte Syntänie wird die gemeinsame Lage von mindestens zwei homologen Genen, die bei zwei oder mehr Spezies ebenfalls gemeinsam auf einem Chromosom lokalisiert sind, bezeichnet. Die homologen Gene werden dann, wenn sie bei mehreren Spezies betrachtet werden, orthologe Gene genannt. Die Reihenfolge der Gene ist bei der konservierten Syntänie ohne Bedeutung. Hochauflösende physikalische und genetische Genkarten der einzelnen Tierspezies sowie vergleichende Genkarten sind Voraussetzung der Positionsklonierung.

1.1.3.1.2 Genetische und physikalische Genkarten

1.1.3.1.2.1 Genetische Karte

Die genetische Genkarte ist eine Kopplungskarte, die sich aus einer Auflistung gekoppelter Gene und DNA-Sequenzen (Kopplungsgruppen) in linearer Ordnung entsprechend ihrer Rekombinationsfrequenz aufbaut. Die Rekombinationsrate spiegelt die Häufigkeit des Auftretens einer ungeraden Anzahl von „Crossing-over“-Ereignissen zwischen zwei Genorten wieder. Da die Möglichkeit für ein „Crossing-over“ proportional zum Abstand beider Genorte ist, kann die Rekombinationsrate als Einheit der Chromosomenlänge verwendet werden. Die Längeneinheit ist ein Morgan [M]; ein centiMorgan [cM] entspricht einer Distanz zweier Genorte, die mit einer Rekombinationsrate von 1% übereinstimmt. Mikrosatelliten sind für das Erstellen dichter Kopplungskarten gut geeignet, da anhand ihrer Polymorphismen ihre Segregation leicht verfolgt werden kann. Einige Mikrosatelliten sind für die vergleichende Kartierung bei verschiedenen Spezies anwendbar, wenn diese eng verwandt sind. Das ist auf die Mikrosatelliten-flankierenden Sequenzen, mit denen sie nachgewiesen werden, zurückzuführen. Diese sind bei eng verwandten Spezies oft konserviert. So kann die Kartenposition eines Markers der einen Spezies für die einer eng verwandten Spezies vorhergesagt werden (Moore et al., 1994). Genetische Genkarten des Rindes sind von Barendse et al. (1997), Bishop et al. (1994), Ferretti et al. (1997) sowie Thomson et al. (2001) publiziert worden.

1.1.3.1.2.2 Physikalische Karte

Die physikalische Karte zeigt die Lokalisation eines Gens oder einer DNA-Sequenz auf seinem Chromosom an (Nicholas, 1996). Die physikalische Kartierung erfolgt auf verschiedenen Wegen. Als Orientierungskordinaten dienen zytogenetische Strukturen. Die kartierten DNA-Sequenzen können Chromosomen, Chromosomenregionen oder auch Chromosomenbanden bzw.-fragmenten zugeordnet werden. Man nutzt dafür die In-situ-Hybridisierung, somatische Hybridzelllinienkonstrukte (*somatic cell hybrid panels*, SCH-Panel) oder

Radiationhybrid (RH)-Zelllinienkonstrukte. Die In-situ-Hybridisierung ermöglicht die Sichtbarmachung einer DNA-Sonde auf einem Zielgewebe, einer Zielzelle, auf Kernen und Chromosomen, so dass die Lage der DNA-Sequenz festgelegt werden kann. Eine Form dieser Methode ist die Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH), die Fluorochrome zur Sondenmarkierung und -detektierung nutzt.

Somatische Hybridzelllinien werden aus Ovarzellen des Chinesischen Hamsters [*Cricetulus griseus*] gewonnen, die verschiedene Chromosomen einer anderen Art enthalten. Das Arbeiten mit diesen Zelllinien ermöglicht nur die Zuordnung von DNA-Sequenzen zu einem Chromosom (Schuler et al., 1996; Kwok et al., 1996). Radiationhybrid (RH)-Zelllinienkonstrukte enthalten neben den Wirtschromosomen (z.B. vom Hamster) einzelne Chromosomenfragmente einer anderen Spezies. Diese Chromosomenfragmente werden durch gezielte radioaktive Strahlung, gemessen in Energiemengen ionisierender Strahlung (=Energiedosis, *radiation absorbed dose*, Rad), erzeugt. Die Chromosomenfragmente der zu untersuchenden Spezies werden dabei in das Genom des Wirtes integriert. Die RH-Kartierung ist eine statistische Methode, die die Distanz zwischen DNA-Sequenzen in centiRad (cR) misst und deren Anordnung auf dem Chromosom festlegt (Cox et al., 1990). Das bovine RH-Zelllinienkonstrukt „BovRH5-Panel“ wurde mit Hilfe von 5000 Rad Gamma Strahlung erstellt (Womack et al., 1997) und ermöglichte die Durchführung der physikalischen Feinkartierung beim Rind. Von Rexroad et al. (2000) sind die Kartierungsmöglichkeiten durch die Erstellung eines „BovRH12-Panels“, erstellt mit Hilfe von 12000 Rad Gamma Strahlung, verbessert worden. Eggen und Fries (1995) sowie Band et al. (2000) publizierten physikalische Chromosomenkarten des Rindes. Eine wichtige Basis der molekularen Genomanalyse ist die Möglichkeit, die Information zu Struktur und Funktion von Genen auf verschiedene Tierarten anzuwenden. Die vergleichende Genomkartierung macht sich diese Möglichkeit zunutze (Collins et al., 1998).

Alternative Methoden zur physikalischen Kartierung sind neben den oben genannten Karten aus chromosomalen Bruchstücken (RH-Karten) z.B. Restriktionskarten, die unter Verwendung selten schneidender Restriktionsenzyme erstellt werden, Klon-Contig-Karten aus sich überlappenden YAC-, Cosmid- oder BAC-Klonen, STS- und EST-Karten sowie die DNA-Sequenzierung (Strachan und Read, 1996).

1.1.3.1.3 Vergleichende Genomkartierung

Der Vergleich von Genomen und Chromosomenmorphologien verschiedener Spezies hat einen großen Teil zu dem Wissen über die Phylogenie von Spezies beigetragen (Wienberg

und Stanyon, 1995). Nicht nur zwischen Säugetierspezies, sondern auch zwischen Vertebraten entfernterer Verwandtschaft konnten konservierte Syntänien bestimmt werden (Wienberg und Stanyon, 1997). Die vergleichende Kartierung basiert auf der Erkenntnis, dass Chromosomenfragmente während der Evolution konserviert wurden.

Vergleicht man eng verwandte Genome, so erhält man Einsicht in Einzelheiten der Genstruktur und -funktion (Collins et al., 1998). Li et al. (1990) zeigten, dass die phylogenetische Trennung von Primaten und Rodentia (Nagetiere) lange vor der der Primaten von den Artiodactyla (Paarzeher) stattfand. Gene und Gengruppen sind daher zwischen Mensch und Rind wahrscheinlich stärker konserviert als zwischen Mensch und Maus oder Rind und Maus. Soller und Beckmann (1990) stellten einen um etwa 50% höheren Grad der Konservierung zwischen Mensch und Rind im Vergleich zu Mensch und Maus fest. Unter den Säugetieren haben Rinder die am besten entwickelten Syntänie- und Kopplungskarten (Eggen und Fries, 1995; Womack und Kata, 1995). Bis jetzt gibt es beim Rind annähernd 500 Gene mit Chromosomenzuweisung (U.S. Bovine Arkansas Database: <http://bos.cvm.tamu.edu/bovgbase.html>). Gene, die bereits bei einer Spezies kartiert sind, liefern Informationen über die mögliche Lage des entsprechenden Gens bei einer weiteren Spezies, sofern konservierte syntänische Chromosomenabschnitte bekannt sind. O'Brien et al. (1993) erleichterten die vergleichende Kartierung mit der Veröffentlichung von Karten ausgewählter Gene für die Spezies Mensch, Maus, Rind und Hauskatze. Band et al. (2000) sowie Rebeiz und Lewin (2000) stellten einen Ansatz zur vergleichenden Kartierung vor, mit dem Chromosomenlokalisationen von ESTs (*expressed sequence tags*, kurze cDNA-Sequenzen) und anderen auf Sequenzen basierenden Markern vorhergesagt werden können (COMPASS-Ansatz, *Comparative Mapping by Annotation and Sequence Similarity*). Damit konnten die Kartenpositionen von zirka 45.000 Rinder-ESTs von Rebeiz und Lewin (2000) identifiziert werden. Band et al. (2000) erstellten mit Hilfe der RH-Kartierung in Verbindung mit der EST-Sequenzierung, der Datenbanksuche für unkartierte Rindergene und dem COMPASS-Ansatz eine das gesamte Genom von Rind und Mensch umfassende Vergleichskarte.

1.1.3.1.3.1 Syntänien zwischen Mensch und Maus zu Rinderchromosom (BTA) 5

Wie bereits in dem Kapitel „Trypanotoleranzstudien bei Rindern“ erwähnt, wurde von Soller und Beckmann 1988 eine QTL-Analyse für die Annäherung des Merkmalkomplexes Trypanotoleranz im Rindergenom vorgeschlagen. Dieser Vorschlag wurde vom ILRI/CGIAR (International Livestock Research Institute/Consultative Group on International Agricultural Research) in Kenia aufgenommen und durchgeführt.

Erste Analysen zeigten unter anderem Genomregionen auf dem Rinderchromosom *BTA5* auf, weshalb die Syntänien zwischen Mensch und Maus zu diesem Chromosom im Folgenden genauer beschrieben werden.

Die große Vielfalt an Karyotypen unter den Säugetieren führte ursprünglich zu der Vermutung, dass die Chromosomen der einzelnen Ordnungen der Säugetiere jeweils neu durchmischt waren (O'Brien et al., 1988). Dies konnte u.a. durch den Vergleich boviner und humaner Kopplungskarten (Womack und Kata, 1995), der Analyse somatischer Hybridzelllinien des Katzensgenoms (O'Brien et al., 1988) und durch Zoo-FISH-Studien (Solinas-Toldo et al., 1995) widerlegt werden. Das Kartieren von Genen bei den verschiedenen Vertebraten-Ordnungen führte zu der Erkenntnis, dass zirka 50 große Genblöcke im Laufe der Evolution erhalten geblieben sind und dass diese Blöcke innerhalb der Ordnungen auf unterschiedlichen Chromosomen zusammengestellt sind (Andersson, et al., 1996). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Hauptanteil in den Chromosomenumordnungen bei den Säugetier-Ordnungen reziproke Translokationen sind und dass Rearrangements innerhalb von Autosomen, abgesehen von Zentromerneubildungen und dem Abbau von Zentromeren, relativ selten stattfinden (Andersson, et al., 1996).

FISH-Analysen zwischen Rind und Mensch zeigten zwei große konservierte Genblöcke zwischen den Chromosomen *HSA12* und *BTA5*, die auf *BTA5* durch kleine konservierte Blöcke von *HSA14* und *HSA22* getrennt sind (Chowdhary et al., 1996; Hayes, 1993; Solinas-Toldo et al., 1995; Band et al., 2000). In etwa entsprechen die beiden großen Blöcke von *HSA12* auf *BTA5* dem jeweils langen und kurzen Arm von *HSA12*. Weitere auf *BTA5* kartierte Gene, die entlang des langen und kurzen Arms von *HSA12* zu finden sind, bestätigten diese Annahme (Janel et al., 1996; Aleyasin und Barendse, 1999; Band et al., 2000).

Nagetierchromosomen haben im Vergleich zu den Chromosomen der anderen Säugetier-Ordnungen eine ungewöhnlich hohe Anzahl an genomischen Rearrangements in der Evolution durchgemacht (Graves, 1996; Carver und Stubbs, 1997). Beim Vergleich der Genome von Maus und Mensch und anderen Spezies sind sowohl erstaunlich große Übereinstimmungen, als auch große Unterschiede in der Anordnung und Gruppierung von Genen auf Chromosomen zu finden (Carver und Stubbs, 1997; Copeland et al., 1993). Diese Unterschiede werden auf eine speziesspezifische Evolution des Karyotyps zurückgeführt (Rettenberger et al., 1995).

Abbildung 1-3 zeigt im Überblick die bekannten konservierten syntänischen Gruppen von Maus und Mensch zum Rinderchromosom *BTA5* (abgewandelte Darstellung der Abbildung aus dem Internet der Bovine Genome Database of the National Animal Genome Research Programm (NAGRP) [<http://bos.cvm.tamu.edu/htmls/Bov5.html>]). Dargestellt sind die zytogenetische Karte und die Kopplungskarte von *BTA5*. Einige der bisher kartierten Gene sind hier in den gängigen Genabkürzungen aufgeführt. Die entsprechenden Chromosomenumordnungen der aufgeführten kartierten Gene von Maus und Mensch sind rechts davon dargestellt.

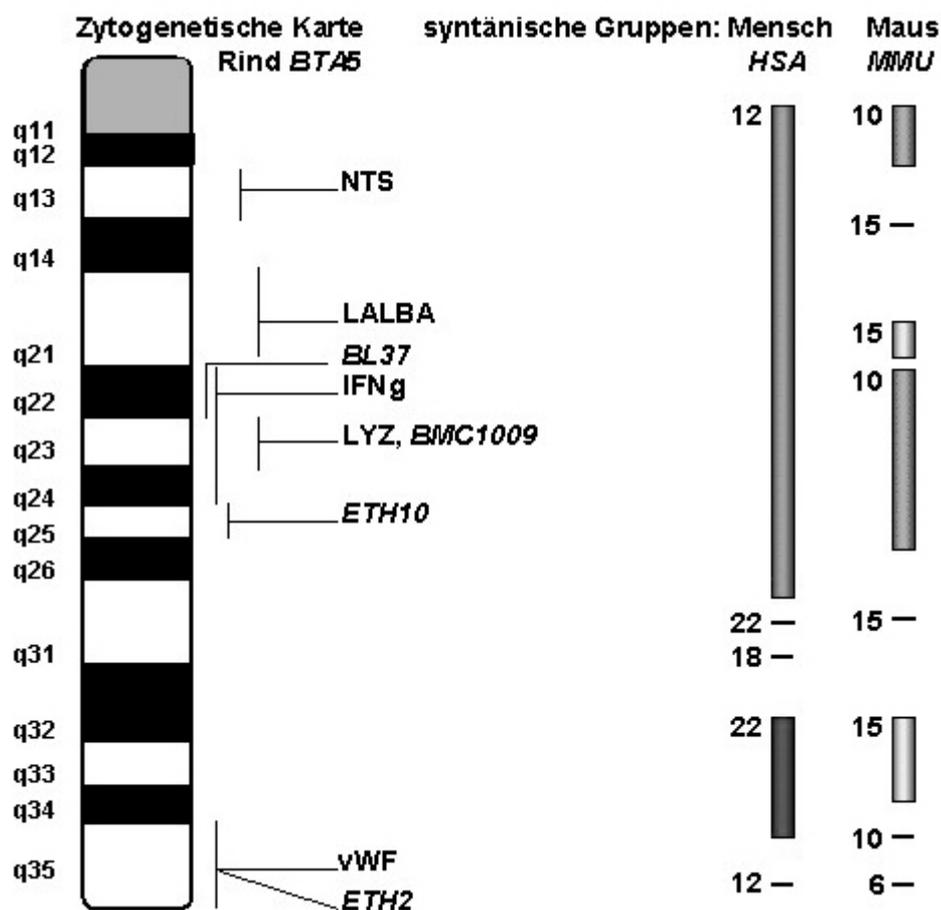


Abbildung 1-3:

Darstellung der zytogenetischen Karte von *BTA5* mit den dazu konservierten syntänischen Gruppen von Mensch und Maus. Die Zahl an der jeweiligen Gruppe entspricht der Chromosomennummer, auf dem die konservierte syntänische Gruppe in der entsprechenden Spezies zu finden ist. Mikrosatelliten in *kursiver*, Gene in normaler Schrift

1.1.4 Beschreibung des Rinderprojektes

„Entwicklung von krankheitsresistentem Nutzvieh“

Das ILRI in Kenia begann 1990 mit der Bearbeitung eines Projektes, das auf die von Soller und Beckmann (1988) empfohlene Methode aufbaut, einen Genomscan mit informativen Markern in einer die Trypanotoleranz-Merkmale segregierenden Rinderpopulation durchzuführen. Das Ziel war, Regionen im Genom zu finden, in denen die Gene liegen, die Trypanotoleranz bzw. die Trypanosuszeptibilität beeinflussen. Die genetischen Informationen über die Marker und die QTL sollen gemeinsam markergestützte Selektion (MAS) für die Zucht trypanotoleranter und wirtschaftlich produktiver Rinder ermöglichen, aber auch zur Identifikation wichtiger Schlüsselgene für die Trypanotoleranz führen.

Für die Untersuchung standen mit einigen gambischen N'Dama-Bullen Tiere aus einer der beiden großen trypanotoleranten Rindergruppen (Langhorn- und Kurzhorn-Rinder, *Bos taurus*) Afrikas zur Verfügung. N'Damas aus Gambia sind keine reinen *Bos taurus*-Abkömmlinge mehr, es ist bereits Einfluss von *Bos indicus* vorhanden. Die Kenyan Borans als susceptible Test-Gruppe des Projekts sind reiner *Bos indicus*-Abstammung. Die ausgewählten N'Damas und Borans waren zuvor noch nicht mit Trypanosomen in Kontakt gekommen, also naiv in Bezug auf diese Infektion.

Im ersten Teil des Projektes wurden Boran-Kühe mit N'Dama-Bullen gekreuzt. Dabei wurde das MOET-Verfahren in Anspruch genommen, um mit einer begrenzten Anzahl von Kühen eine hohe Vollgeschwister-Anzahl züchten zu können (Kemp und Teale, 1991; Kennedy, 1992; Teale, 1993).

Zwei Vollgeschwisterfamilien (F₁-Generation) wurden so 1991 aus den N'Dama- und Boran-Elterntieren (F₀-Generation) gezüchtet. Jede Familie bestand aus mehr als 30 Kälbern. In einem Vorversuch wurden 38 Tiere aus dieser F₁-Generation und 10 Boran-Rinder als Kontrolltiere mit *T. congolense* mittels Tsetse-Fliegen der Art *Glossina morsitans centralis* kontrolliert infiziert. Drei der 38 Tiere aus der F₁-Generation benötigten anschließend therapeutische Maßnahmen, während im Vergleich dazu sechs der zehn Borans behandelt werden mussten.

Aus der F₀-Generation wurden anschließend vier N'Dama-Bullen und vier Boran-Kühe ausgewählt. 14 ihrer direkten Nachkommen (F₁-Generation) wurden untereinander gekreuzt und so für die Zucht der F₂-Generation herangezogen. In sieben Familien wurden 183 Tiere

gezüchtet. Als Kontrolltiere wurden zusätzliche N'Dama- und Boran-Rinder mit in das Experiment einbezogen.

Da es keine systematisch erprobten Maßeinheiten gibt, die den Phänotyp Trypanotoleranz umfassend beschreiben oder genau definieren, sind 16 Phänotypen (siehe Kapitel 7.4) zusammengestellt worden, die versuchen, ein Spektrum an Merkmalen bei den Rindern vor, während und nach einer Infektion mit Trypanosomen zu erfassen. Diese Merkmale sind in zwei Kategorien aufgeteilt:

- I. Parameter, die den Zustand nicht-infizierter Tiere hinsichtlich der Konstitution und Anämie beschreiben wie Gewicht (BW) und Hämatokrit (PCV) jeweils zum Ausgangszeitpunkt der Studie (initial BW, initial PCV).
- II. Parameter, die den mehr oder minder schweren Krankheitsverlauf durch die Infektion bei suszeptiblen und trypanotoleranten Tieren, sowie den Tieren, die verschiedene Abstufungen der Toleranz zeigen, beschreiben. Diese Parameter werden über den gesamten Verlauf der Erkrankung gemessen.

Der Genotyp von bekannten DNA-Markern wurde bei den Tieren ermittelt und zusammen mit den Phänotypen zu QTL-Analysen herangezogen. Zunächst wurde versucht, die N'Dama- und Boran-Populationen mit Inzuchtpopulationen gleichzusetzen (Soller, 1991), also davon auszugehen, dass die Allele der Marker zwischen den beiden Populationen unterschiedlich sind. Es musste jedoch vereinzelt festgestellt werden, dass die unterschiedlichen Allele der Marker und Loci in beiden F_0 -Populationen und Folgepopulationen auftraten (Beckmann und Soller, 1988). Das QTL-Analyse-Modell wurde an diese Problematik angepasst (Beckmann und Soller, 1988), indem diese Fälle statistisch berücksichtigt wurden. Es zeigte sich, dass man die Analyse somit zwar auf dem Prinzip von Inzuchtpopulationen durchführen konnte, jedoch in den F_2 -Familien individuell jeden Marker einzeln in Bezug auf die Informativität der F_0 - und F_1 -Generation betrachten muss. Die statistische Aussagekraft der diallelischen Marker war gering, stieg aber bei polyallelischen Markern stark an. Nicht nur alle Marker, sondern auch Intervalle zwischen zwei Markern wurden so auf einen Phänotyp-Parameter bezogen. Mit kombinierten Parametern wurde genauso verfahren.

1998 wurden die ersten Ergebnisse auf der *Animal Genetics* Konferenz, Auckland, Neuseeland innerhalb der kooperierenden Arbeitsgruppen dargestellt und diskutiert: Drei mit Anämie gekoppelte N'Dama Trypanotoleranz-QTL wurden identifiziert. Diese drei QTL liegen auf den Chromosomen *BTA2*, *BTA5* und *BTA7*. Ein zusätzlicher, mit dem Merkmal

Parasitämie gekoppelter QTL wurde auf *BTA7*, und ein an das kombinierte Merkmal aus Körpergewicht und Hämatokrit gekoppelter QTL wurde auf *BTA5* gefunden.

Die folgenden Abbildungen 1-4 und 1-5 zeigen die auf *BTA5* gefundenen QTL in Form von zwei Graphen: Die X-Achse beschreibt das Chromosom der Länge nach in cM. Eine zweite X-Achse zeigt die Positionen der Marker (und die Intervalle, die sie bilden), mit denen die QTL-Analyse durchgeführt wurde (Quelle: Hanotte, Internationales Symposium: „Candidate Genes for Animal Health“, in Rostock-Warnemünde, 1999).

Die Y-Achse skaliert den Lodscore, eine statistische Einheit der QTL-Analysen. Die Einheit Lodscore (Lod = Logarithm of the odds) ist der Logarithmus der Wahrscheinlichkeit für Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp (Lander und Schork, 1994). Ein Lodscore von 3.0 sagt aus, dass die Wahrscheinlichkeit, dass der Phänotyp mit dem Genotyp gekoppelt ist, 1000 mal höher ist als die Wahrscheinlichkeit, dass der Phänotyp nicht mit dem Genotyp gekoppelt ist. Er gilt bei einer QTL-Lokalisierung als hinreichendes Kriterium für das Vorliegen von Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp.

Trypanotoleranz-QTL auf *BTA5*

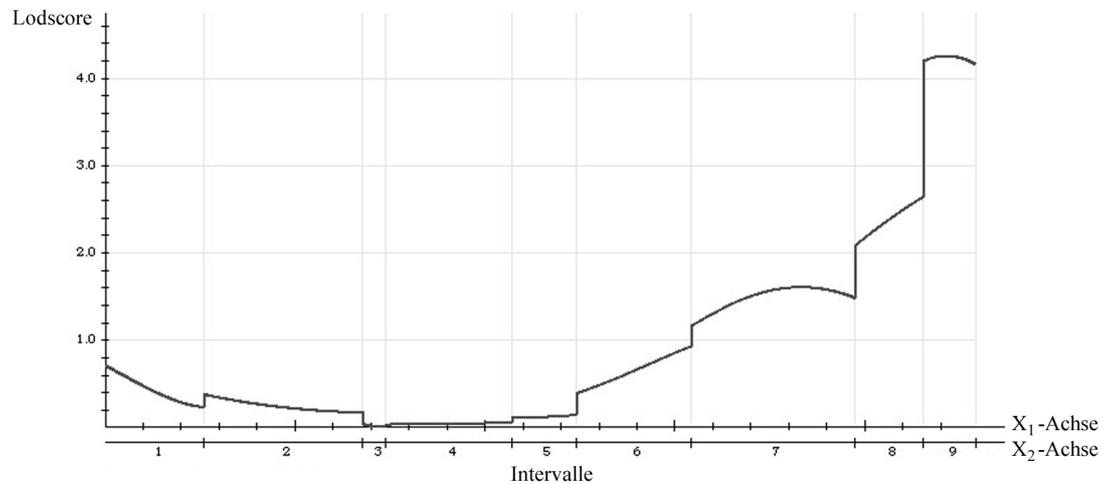


Abbildung 1-4: QTL auf *BTA5* für den Phänotyp PCV V-PCV IF (Varianz des durchschnittlichen PCV-Wertes minus den Hämatokritwert vor und am letzten Tag der Infektion), $r = -0.743$; maximaler Lodscore: 4.250 (Position: *MAF48*), Standardabweichung: 21.37

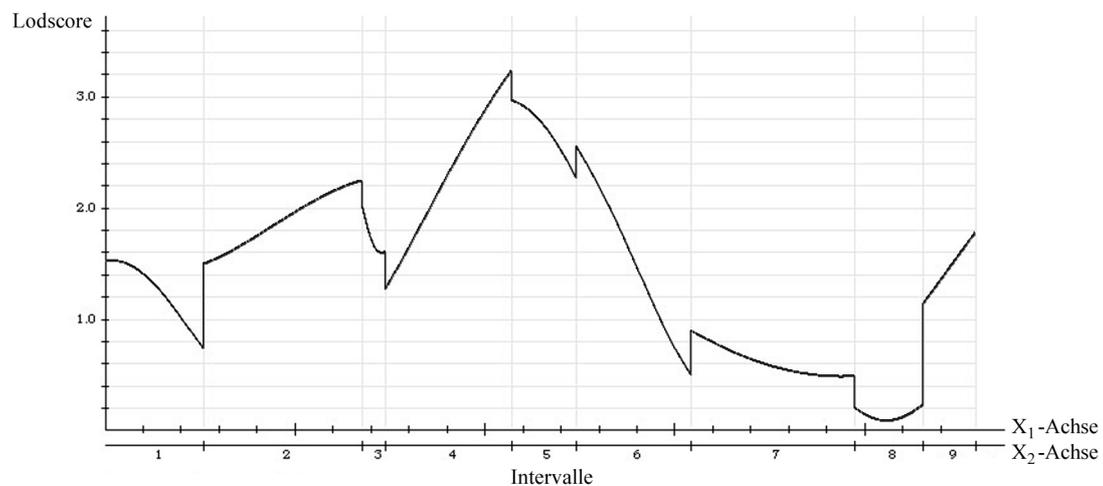


Abbildung 1-5: QTL auf *BTA5* für den Phänotyp BWD150 – PCV V (prozentualer Abfall des Körpergewichtes über den Zeitraum der Infektion minus der Varianz des durchschnittlichen Hämatokrit-Wertes), $r = 0.666$; maximaler Lodscore 3.228 (Position: *BR2936*), Standardabweichung: 26.16.

Abbildung 1-4 und **Abbildung 1-5:** Die X_1 -Achsen beschreiben das Chromosom *BTA5* der Länge nach in cM. Die X_2 -Achsen zeigen die Positionen der Intervalle (I). Die Intervalle werden von folgenden Markern gebildet: **I 1:** *BP01 – BM321*, **I 2:** *BM321 - LYZ* (Lysozym), **I 3:** *LYZ – BL37*, **I 4:** *BL37 – BR2936*, **I 5:** *BR2936 – ETH10*, **I 6:** *ETH10 – ETH2*, **I 7:** *ETH2– BM2830*, **I 8:** *BM2830 – MAF48*, **I 9:** *MAF48 –ETH152*. Die Y-Achse skaliert den Lodscore.

1999 wurden diese Ergebnisse durch abschließende QTL-Berechnungen der F₂-Generation von Hanotte und Korol bestätigt, wobei auch Hinweise auf weitere QTL gefunden wurden. Diese Daten wurden 1999 auf dem internationalen Symposium: „*Candidate Genes for Animal Health*“, in Rostock-Warnemünde vorgestellt.

In der in Abbildung 1-5 dargestellten QTL-Region nahm der Mikrosatellit *BR2936* als Intervallgrenze zwischen Intervall 4 und 5 eine zentrale Lage ein. Um mehr Marker für die QTL-Region zu erhalten, wurde aus ihr weiträumig um den Mikrosatelliten herum eine chromosomensegmentspezifische Bibliothek erstellt (Goldammer et al. 1998, unpubliziert).

Zur Herstellung dieser spezifischen Bibliothek von Chromosom *BTA5q21-24* wurden Chromosomen im Metaphasestadium auf Objektträgern fixiert. Eine spezielle Anfärbung der Metaphasechromosomen stellt deren q-Bänderung dar, an der sich orientiert wurde: *BR2936* liegt in publizierten Kopplungskarten auf Chromosom *BTA5* bei 63cM, neben dem zusätzlich zytogenetisch kartierten Mikrosatelliten *BL37* (50cM, *BTA5q22*). Die zwei zytogenetisch kartierten Gene Lysozym (*LYZ*, *BTA5q23*) und Interferon γ (*BTA5q22-24*) in der QTL-Region gaben die Größe des Chromosomensegments an, das ausgeschnitten werden musste. Das gewünschte Segment wurde mit einer feinen Glasnadel herausgeschnitten (Abb. 1-6) und mit Hilfe von Zufallsprimern in einer Polymeraseketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt.

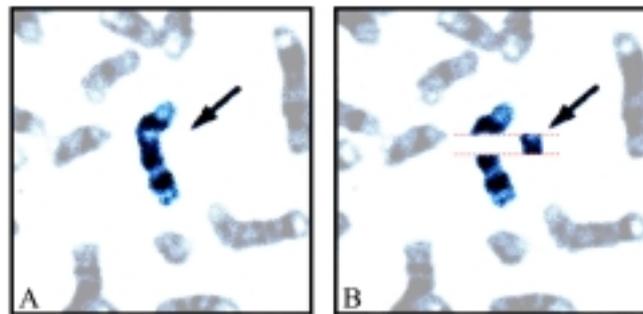


Abbildung 1-6

(A) Identifikation des Metaphasechromosoms *BTA5* anhand der q-Bänderung

(B) Herausgeschnittene Chromosomenregion q22-24.

Quelle: Goldammer, FBN, Dummerstorf.

Die Spezifität des Amplifikats wurde anschließend mit Hilfe von FISH überprüft und stand für diese Arbeit zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung.

1.1.5 Beschreibung des Mausmodells zur Trypanotoleranz

Ein Vergleichsmodelltier für Kopplungsanalysen über Trypanotoleranz ist die Maus (Kemp et al., 1996). Die kurze Fortpflanzungsdauer von Mäusen und die Verfügbarkeit von Inzuchtlinien erleichtern neben der weit vorangeschrittenen Entwicklung von hoch auflösenden Maus-Genkarten das Aufbauen und Analysieren von Modellpopulationen (Dietrich et al., 1994).

Bei Mäusen sind Suszeptibilität und Toleranz gegenüber Trypanosomen in diversen Inzuchtlinien unterschiedlich stark ausgeprägt (Murray et al., 1982; Morrison et al., 1978; Whitelaw et al., 1980): Während der Inzuchtstamm C57Bl/6 eine hohe Toleranz gegenüber *T. congolense* zeigt, sind die Mäuse des Balb/c-Inzuchtstammes sehr anfällig für die Infektion. Trotzdem sich der Krankheitsverlauf und die Immunantwort bei Maus und Rind unterscheiden, könnten Kenntnisse über die genetischen Mechanismen, die die Resistenz bei dem C57Bl/6-Inzuchtstamm bewirken, hilfreich für das Verständnis der Resistenzmechanismen beim Rind sein (Kemp et al., 1996).

200 männliche und 200 weibliche Tiere einer F₂-Generation von Balb/c x C57Bl/6 Mäusen wurden mit *T. congolense* infiziert. Bei allen Tieren, inklusive den Kontrollgruppen (10 männliche Balb/c -, 10 weibliche Balb/c-, 10 männliche C57Bl/6 - und 10 weibliche C57Bl/6 - Mäuse) wurden die Auswirkungen der Infektion dokumentiert und analysiert, indem je 16% der Tiere mit der kürzesten und mit der längsten Überlebensdauer mit 90 Mikrosatelliten genotypisiert wurden. Die statistische Aussagekraft dieses selektiven Genotypisierens entspricht der Aussagekraft einer genotypisierten Population von 320 Tieren (Darvasi und Soller, 1992). Mit einem QTL-Analyse-Programm [MAPMAKER/QTL (Lincoln et al., 1992)] ergaben sich folgende Ergebnisse (Kemp et al., 1996):

F₂-Generation aus Kreuzungen von Balb/c- und C57Bl/6-Tieren

- Auf Chromosom *MMU (Mus musculus)* 17 fand sich ein QTL für den Phänotyp Überlebensdauer bei Infektion. Der breite QTL und die hohe Varianz in der F₂-Population ließen mehr als einen Locus innerhalb der Region vermuten. Die beteiligten Allele zeigten einen additiven Effekt in der Ausprägung.

- Die Chromosomen *MMU1* und *MMU5* zeigten ebenfalls eine signifikante Assoziation mit dem Phänotyp Überlebensdauer bei Infektion, wobei in dem Fall von Chromosom *MMU1* der Alleleffekt additiv, der von Chromosom *MMU5* jedoch dominant ist.

Die Einkreuzung eines weiteren suszeptiblen Inzuchtstammes (A/J-Stamm) und die anschließende Analyse bestätigten diese Ergebnisse nur zum Teil (Kemp et al., 1997):

F₂-Generation aus Kreuzungen von A/J- und C57Bl/6-Tieren

- Die QTL auf *MMU17* und *MMU5* bestätigten sich, jedoch waren die Alleleffekte bei beiden rezessiv.
- *MMU1* zeigte keine Assoziation zum Phänotyp Überlebensdauer bei Infektion.

Der Unterschied in den Alleleffekten bei den beiden Kreuzungen wird auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der beiden suszeptiblen Inzuchtstämme Balb/c und A/J zurückgeführt, der Einfluss auf die Expression und Dominanz nimmt (Kemp et al., 1997).

Die Vertrauensintervalle der drei QTL in der F₂-Generation aus Kreuzungen von Balb/c- und C57Bl/6-Tieren zeigen auf den Chromosomen Größen von 10cM bis 40cM. Diese hohen Werte entstehen in erster Linie durch die limitierte Anzahl von Rekombinationsereignissen in den Chromosomenregionen der QTL der F₂-Generationen (Darvasi und Soller, 1995). Um die Anzahl der Rekombinationsereignisse zu erhöhen, wurden aus den beiden verschiedenen F₂-Generationen zwei unabhängige F₆-Generationen (*advanced intercross lines*, AILs; Darvasi und Soller, 1995; Darvasi, 1998) gezüchtet und analysiert (Iraqi, 2000). Die Werte (in cM) der Vertrauensintervalle der QTL-Regionen wurden in den F₆-Generationen stark eingengt (Iraqi et al., 2000). Die Zucht von intervallspezifischen kongenen Tieren (*interval specific congenic strains*, ISCSs) und eine anschließende QTL-Analyse führten für den QTL auf *MMU17* zur weiteren Einengung. Von dieser Region wurde eine Kandidatengenliste erstellt. Ein wichtiger Kandidat für diese Region auf Chromosom *MMU17* ist z.B. der Tumornekrosefaktor alpha (Iraqi et al., 2001).

Diese fortgeschrittenen Analysen bei dem Mausmodell helfen indirekt bei der Einengung der QTL-Regionen für Trypanotoleranz beim Rind: Je genauer die QTL-Regionen bei der Maus bekannt sind, desto leichter lassen sich durch vergleichende Kartierung konservierte syntänische Gruppen zwischen den QTL-Regionen der Maus und dem Rind ermitteln. Die Erhöhung der Auflösung der Genkarten lässt wiederum eine gezieltere Auswahl von Kandidatengenen zu.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll eine physikalische Karte für Chromosom *BTA5* aus neu identifizierten und bereits bekannten Typ-I- und Typ-II-Marker erstellt werden. Ziel ist es, die Markerdichte für *BTA5* zu erhöhen, um eine neue QTL-Analyse hinsichtlich des Merkmalkomplexes Trypanotoleranz durchzuführen.

Die neu kartierten Typ-I-Marker (Gene) sollen einerseits helfen, Kandidatengene für den Trypanotoleranz-QTL zu identifizieren und andererseits dazu dienen, allgemeinere Informationen über die Genzusammensetzung des Chromosoms *BTA5* zu erhalten. Dazu werden konservierte syntänische Gruppen zwischen Rind, Menschen und Maus analysiert.

Um Typ-II-Marker aus der QTL-Region zu erhalten, die in der vorangegangenen QTL-Analyse ermittelt wurde (Hanotte und Korol, nicht publiziert), wurde von Goldammer et al. (nicht publiziert) eine chromosomensegmentspezifische Bibliothek der Region q21-24 des Chromosoms *BTA5* angefertigt und für die hier beschriebene Arbeit zur Verfügung gestellt.

Eine neue QTL-Analyse, die auf den neu ermittelten Typ-I- und Typ-II-Markern basiert, soll zur Bestätigung und gegebenenfalls zu einer Einengung der an der Trypanotoleranz beteiligten chromosomalen Region auf *BTA5* führen.

Zusammenfassend lässt sich die Zielsetzung der Arbeit in folgende Aufgabenbereiche gliedern:

- Identifizierung neuer Typ-I- und Typ-II-Marker auf Chromosom *BTA5*
- Lokalisierung der neuen Typ-I- und Typ-II-Marker auf *BTA5*
- Erneute QTL-Analyse mit Hilfe der neuen Marker hinsichtlich des Merkmalkomplexes Trypanotoleranz

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 DNA verschiedener Säugetiere

DNA vom Rind (*Bos taurus*)

Die untersuchte Rinderpopulation wurde aus Kreuzungen zwischen trypanotoleranten N'Dama-Bullen (*Bos taurus*) und für die Trypanosomiasis anfälligen Boran-Kühen (*Bos indicus*) aufgebaut. Durch Kreuzungen innerhalb der F₁-Generation wurden sieben Vollgeschwister-Familien gezüchtet. Insgesamt 8 Tiere bilden die F₀-Generation, 14 Tiere die F₁- und 183 Tiere die F₂-Generation.

Von den Tieren der gesamten Population stand genomische DNA aus Vollblut zur Verfügung.

DNA von der Maus (*Mus musculus*)

Maus-DNA (Firma Novagen) wurde als Kontroll-DNA benutzt, wenn Oligonukleotidprimer für die Amplifikation von Genfragmenten aus bekannten Gensequenzen der Maus abgeleitet wurden. Ferner wurde mit Maus-DNA geprüft, ob Primer, die von Rind oder Mensch abgeleitet sind, mit Nagetier-DNA kreuzhybridisieren.

DNA vom Menschen (*Homo sapiens*)

Aus einer Vollblutspende isolierte menschliche DNA wurde als Kontroll-DNA verwendet, wenn Oligonukleotidprimer für die Amplifikation von Genfragmenten aus humanen Sequenzen abgeleitet wurden.

DNA von Hamstern (*Cricetulus griseus*)

Hamster-DNA aus dem Labor von Womack (Texas A&M University, USA) wurde benötigt, um Kreuzhybridisierungen von Oligonukleotidprimern mit Hamster-DNA ausschließen zu können. Hamster-DNA diente als Matrize für Polymerasekettenreaktionen (*polymerase chain reaction*, PCR).

2.1.2 Chromosomensegmentspezifische DNA-Bibliothek

Um neue Marker für das Rinderchromosom *BTA5* zu finden, wurde von Goldammer (1999, nicht publiziert) eine chromosomensegmentspezifische DNA-Bibliothek der QTL-Region *BTA5* q21-24 angefertigt. Dazu wurden Chromosomen im Metaphasestadium auf Objekt-

trägern fixiert und das gewünschte Segment von *BTA5* mit einer feinen Glasnadel herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde anschließend durch PCR mit degenerierten Oligonukleotiden 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3' amplifiziert. Das PCR-Amplifikat wurde in einen Vektor (PCR-Script AMP Cloning KIT, Stratagene) ligiert. 9µl Ligationsansatz standen in einer Konzentration von 6ng/µl zur Verfügung.

2.1.3 Somatische-Hybridzelllinien-DNA

(somatic cell hybrid panel / SCH-Panel)

31 verschiedene DNA-Proben somatischer Hybridzelllinien aus chinesischen Hamster-Ovarzellen (*Cricetulus griseus*) mit Rinderchromosomenanteilen (*Bos taurus*), entwickelt von Womack und Moll (1986), wurden aus dem Labor von Womack (Texas A&M University, USA) bezogen. Von jeder Hybridzelllinie stand DNA in einer Konzentration von 200ng/µl zur Verfügung, die mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) auf je 50ng/µl eingestellt wurde. Die DNA wurde als Matrize für PCR-Analysen eingesetzt. Laboreigene Rinder- und Maus-DNA stand für Positiv- und Negativkontrollen zur Verfügung.

2.1.4 Hybrid-Zelllinien mit radioaktiv bestrahlter Rinder-DNA

(radiation hybrid panels / BovRH5- und BovRH12-Panels)

Für die Konstruktion dieser Hybrid-Zelllinien wurde eine Aberdeen-Angusbullen-Fibroblastenzelllinie mit (⁶⁰Cobalt) letal radioaktiv bestrahlt. Je nach Strahlendosierung entstehen zwischen 0,5 - 30 Millionen Basenpaare große Chromosomenfragmente (Knippers, 2001), die von einer Empfängerzelllinie (chinesischer Hamster) in das Genom integriert werden. Isolierte DNA dieser so veränderten Empfängerzelllinien wurde für PCRs eingesetzt. Mit chromosomenspezifischen Markern können die in die Nagetierzelllinien integrierten Rinderchromosomenfragmente bestimmten Rinderchromosomen zugeordnet werden.

Für die PCR-Untersuchungen standen DNA-Proben von zwei Hybrid-Zelllinienkonstrukten zur Verfügung:

- I. Das Hybrid-Zelllinienkonstrukt aus mit einer Energiedosis von 5000 Rad Gamma-Strahlung (*radiation absorbed dose*, Rad) behandelte Rinder-DNA (BovRH5-Panel) besteht aus 90 Hybrid-Zelllinien und zusätzlichen Positiv- und Negativ-Kontrollen. Dieses Hybrid-Zelllinienkonstrukt wurde von Womack et al. (Texas A&M University, USA; 1997) entwickelt.

- II. Das Hybrid-Zelllinienkonstrukt aus mit 12000 Rad behandelte Rinder-DNA (BovRH12 Panel, konstruiert von Rexroad et al., 2000) besteht aus 182 Hybridzelllinien, sowie den für PCR-Untersuchungen üblichen Positiv- und Negativ-Kontrollen.

Radiationhybrid-Panels ermöglichen die Analyse der räumlichen Nähe zweier Loci zueinander auf einem Chromosom. Das Hybrid-Zelllinienkonstrukt aus einer 5000 Rad Gamma-Strahlung behandelte Rinder-DNA (BovRH5-Panel) soll Marker, die weniger als 10cM auseinanderliegen, als gekoppelt erscheinen lassen (Womack, pers. Mitteilung). Das Hybrid-Zelllinienkonstrukt aus mit 12000 Rad behandelte Rinder-DNA zeigt eine höhere Bruchfrequenz zwischen benachbarten Markern als das BovRH5-Panel (Rexroad et al., 2000) und dient so der feineren Kartierung von Markern.

Von jeder der einzelnen Hybridzelllinien der beiden unterschiedlich stark bestrahlten Zelllinienkonstrukte stand DNA in einer Konzentration von 200ng/μl zur Verfügung, die mit ddH₂O auf je 50ng/μl eingestellt und für PCR-Untersuchungen eingesetzt wurde.

2.1.5 Klone künstlicher Bakterien-Chromosomen

(bacteria artificial chromosome, BAC)

Bovine BAC-Klone wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (<http://www.rzpd.de>) aus der Rinder-BAC-Bibliothek Nr. 750, hergestellt von Miller und Williams (BOREALIS-Projekt) sowie Zhu et al. (1999), bezogen. Die BAC-Klone bestanden aus mit *EcoRI* teilverdauter Lymphozyten-DNA von Jersey-Bullen (*Bos taurus*), die in den Vektor pBACe3.6 kloniert wurde. Das eingefügte Rinder-DNA-Fragment hatte eine durchschnittliche Größe von 105kb mit einer Mindestgröße von 60kb und einer maximalen Größe von 200kb. Transformierte *E.coli* DH10B Zellen bilden die aus zirka 138240 Klonen bestehende bovine BAC-Bank und repräsentieren 5 bis 6 Genomäquivalente.

2.1.6 DNA-Längenstandard

100bp-DNA-Leiter pME-80 DNA (peqlab), vollständig verdaut mit *Eco*147 I und
Pvu I Konz.: 0,5mg DNA/ml

2.1.7 Oligonukleotide

Die als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden mit dem Primer3Input-Programm (siehe Kapitel 7.1.8) erstellt. Primer für bekannte Typ-II-Marker (Mikrosatelliten) wurden mehreren Datenbanken im Internet entnommen (siehe Kapitel 7.1.8).

Die Synthese erfolgte entweder im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNI), Hamburg, mit Hilfe eines DNA-Syntheseautomaten (Gene Assembler® Plus, DNA-Synthesizer, Pharmacia LKB) oder durch die Firmen MWG und Gibco/life technologies.

Primer zum Sequenzieren von Vektorinserts wurden von dem Vektor pPCR-Script AMP SK(+) Plasmid (Stratagene) abgeleitet. Die von Stratagene zur PCR-Amplifikation empfohlenen M13(-20)- und M13reverse Primer wurden in verlängerter Form eingesetzt, um eine höhere Spezifität zu erreichen (Gelhaus, pers. Mitteilung). Laborintern wurden sie M₂₄forward und M₂₄reverse genannt:

M₂₄forward (5' → 3') ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT

M₂₄reverse (5' → 3') CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGT

Der Vektor besteht aus 3001bp. Die Primer flankieren die Vielfachklonierungsstelle. Sie amplifizieren zusätzlich zum Insert 228bp Vektorsequenz.

2.1.7.1 Eingesetzte Oligonukleotidprimer

Die verwendeten Primer und ihre PCR-Bedingungen ergeben mit Rinder-DNA PCR-Produkte, die sowohl in der Sequenz als auch in der Fragmentlänge spezifisch für Rinder sind. Ihre Bezeichnungen, Abkürzungen, Sequenzen und PCR-Bedingungen sind im Anhang aufgelistet (siehe Kapitel 7.2).

2.1.8 Computerprogramme für die statistische Datenanalyse

2.1.8.1 RHMAP Version 3.0

Statistical Package for Multipoint Radiation Hybrid Mapping

Für die statistische Datenanalyse der Zelllinienhybridkonstrukte BovRH5 und BovRH12 wurde das Softwareprogramm RHMAP Version 3.0 (Lange et al., 1995; Lunetta et al., 1996) verwendet. Die RHMAP-Analyse basiert auf der Annahme, dass die Brüche der Chromosomen eines Zelllinienhybridkonstruktes durch die radioaktive Strahlung zufällig entlang des Chromosoms und somit unabhängig von der Chromosomenstruktur entstanden sind.

Da das Standardprogramm für 99 PCR-Signale ausgerichtet ist, wurde es für die Daten des BovRH12-Panels nach Angaben von K'anga (ILRI/Kenia, pers. Mitteilung) erweitert.

2.1.8.2 GeneHunter Version 2.0 beta

GeneHunter Version 2.0 beta (<http://linkage.rockefeller.edu/soft/gh/>) wird neben anderen Programmen für Kopplungsanalysen auf parametrischer oder nichtparametrischer Ebene eingesetzt.

GeneHunter wurde für kleine Stammbäume entwickelt, da eine limitierte Analysekapazität für große und komplizierte Stammbäume besteht. Stammbäume mit bis zu 30 Individuen können jedoch mit dieser Software gut analysiert werden. Um dieses Programm auf die zu untersuchende Rinderfamilie anwenden zu können, wurden die Familien der F₁-Generation mit Hilfe eines Zusatzprogrammes (Müller-Myhsok, nicht publiziert) in Subfamilien zu je 6 Tieren aufgeteilt (2 Großeltern, 2 Elterntiere, 2 Jungtiere). Dabei bildet jedes Jungtier jeweils einmal mit jedem seiner Geschwister, den Eltern und Großeltern eine solche Subfamilie. Die Genotypen der Subfamilien wurden gemeinsam auf Kopplung mit den Merkmalen hin analysiert.

2.1.9 Reaktionssysteme (Analysekits)

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)
- DNA Sequencing Kit (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems))
- NucleoBond BAC 100 (Macherey-Nagel)
- PCR-Script™ Amp Cloning Kit (Stratagene)

2.1.10 Lösungen und Puffer

Ethidiumbromid-Stammlösung:	10mg Ethidiumbromid/ml ddH ₂ O
DNA-Auftragspuffer	0,1% Bromphenolblau
6fach konzentriert:	0,1% Xylen Cynol
	40% Saccharose (w/v) in ddH ₂ O
	Lagerung bei 4°C
TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA)	242g Tris-Base
50fach konzentriert:	57ml Eisessig
	100ml 0,5M EDTA pH8,0
	ad 1000ml H ₂ O, autoklavieren
	Lagerung bei Raumtemperatur
TBE-Puffer (Tris/Borat/EDTA)	108g Tris-Base
10fach konzentriert:	55g Borsäure
	40ml 0,5M EDTA pH8,0
	ad 1000ml H ₂ O, autoklavieren
	Lagerung bei Raumtemperatur

2.1.11 Nährmedien für Bakterienkulturen

Luria Bertani (LB)-Medium:	10g NaCl 10g Bacto-Tryptone 5g Hefeextrakt pH7,2 mit 10M NaOH einstellen ad 1000ml H ₂ O am gleichen Tag autoklavieren, Lagerung bei 4°C
LB-Ampicillin-Agar:	1000ml LB-Medium 15g Agar autoklavieren und abkühlen lassen auf ca. 50°C 50µg/ml Ampicillin (=0,5ml aus Stock 100mg/ml) Platten gießen, fest werden lassen, Lagerung bei 4°C
LB-Chloramphenicol-Agar:	1000ml LB-Medium 15g Agar autoklavieren und abkühlen lassen auf ca. 50°C 30µg/ml Chloramphenicol (=0,3ml aus Stock 100mg/ml) Platten gießen, fest werden lassen, Lagerung bei 4°C
Kasein-Hydrolysat (<i>casein hydrolysate</i> + <i>yeast</i> , NZY ⁺)-Medium mit Hefeextrakt:	10g NZ Amin (Kasein-Hydrolysat) 5g Hefeextrakt 10g NaCl autoklavieren 12,5ml 1M MgCl ₂ und 12,5ml 1M MgSO ₄ sowie 20ml 20%(w/v) Glukose dazugeben und sterilfiltrieren

2.1.12 Enzyme

<i>Taq</i> DNA-Polymerase:	aus <i>Thermus aquaticus</i> Konz.: 5 U/μl (Pharmacia)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase*:	aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> , * mit stark eingeschränkter Exonukleaseaktivität (spezielles Produkt der Fa. Stratagene) Konz.: 0,5 U/μl (Stratagene)
T4 DNA-Ligase:	aus <i>E.coli</i> Lambda Lysogen NM 989 Konz.: 4 U/μl (Pharmacia)
<i>Srf</i> I-Restriktionsenzym:	aus <i>Streptomyces</i> -Spezies (pat. T.G. Simcox) Konz.: 5 U/μl (Stratagene)
<i>Sty</i> I-Restriktionsenzym:	aus <i>E. coli</i> WA921/pST27 hsd ⁺ Konz.: 10 U/μl (New England Biolabs)
<i>Fnu</i> 4HI-Restriktionsenzym:	aus <i>E. coli</i> , welches das <i>Fnu</i> 4HI-Gen von <i>Flavobacterium okeanokoites</i> trägt Konz.: 5 U/μl (New England Biolabs)
<i>Pst</i> I-Restriktionsenzym:	aus <i>E. coli</i> , welches das <i>Pst</i> I-Gen trägt von <i>Providencia stuartii</i> Konz.: 20 U/μl (New England Biolabs)
<i>Nco</i> I-Restriktionsenzym:	aus <i>Nocardia corallina</i> Konz.: 10 U/μl (Amersham/Pharmacia)
<i>Rsa</i> I-Restriktionsenzym:	aus <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> Konz.: 4 U/μl (Amersham/Pharmacia)
<i>Bsr</i> I-Restriktionsenzym:	aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> Konz.: 5 U/μl (New England Biolabs)
<i>Xho</i> I-Restriktionsenzym:	aus <i>Xanthomonas holicicola</i> Konz.: 15 U/μl (Amersham/Pharmacia)

2.2 Methoden

2.2.1 Vergleichendes Kartieren von Genen

Als Basis für die vergleichende Kartierung diente die bekannte Syntänie zwischen dem bovinen Chromosom *BTA5* und dem humanen Chromosom *HSA12*. Gene, deren Lage auf *HSA12* bekannt war, wurden mit Hilfe der somatischen Hybridzelllinien DNA auf *BTA5* kartiert. Wurde die Chromosomenzugehörigkeit geklärt, wurde die genauere Lage der Gene auf dem Chromosom mit Hilfe der BovRH5- und BovRH12-Panels bestimmt. Es wurden Gruppierungen und bestimmte Reihenfolgen von Genen auf *BTA5* gefunden, die mit denen von Mensch und Maus verglichen wurden. Vermutungen über mögliche Nachbargene der bereits auf *BTA5* kartierten Gene wurden durch dieses Vergleichen angestellt und deren Positionen mit Hilfe der somatischen Hybridzelllinien-DNA bestätigt oder verworfen.

2.2.1.1 Auswahl von Genen (Typ-I-Marker) und anonymen Markern (Typ-II-Marker) zur Kartierung

Die Auswahl aller Marker erfolgte aufgrund ihrer Position auf Chromosom *BTA5*.

Zusätzlich zu Genen, deren Lage auf Chromosom *BTA5* bekannt war, wurden weitere ausgewählt, von denen angenommen werden konnte, dass sie auf *BTA5* liegen. Diese Annahme basierte auf der Analyse konservierter syntänischer Gruppen zwischen Rind, Mensch und Maus. Einige Gene wurden allein aufgrund ihrer möglichen Lage in der QTL-Region ausgewählt, andere wurden ausgewählt, da ihre Funktion möglicherweise Einfluss auf das Krankheitsbild Trypanotoleranz zeigen könnte.

Für die Auswahl von anonymen Markern standen verschiedene bovine physikalische Kopplungskarten zur Verfügung, die die Positionen der Marker in centiMorgan (cM) angeben. Über das ganze Chromosom verteilte Typ-II-Marker wurden ausgewählt. Dabei wurde versucht, Abstände von zirka 10cM einzuhalten.

2.2.1.2 Kurzdarstellung der ausgewählten Kandidatengene

CD9-Antigen (*CD9 antigen*, *CD9*)

CD9 ist ein transmembranes Glykoprotein, dessen Funktion im Bereich der Zellmigration und –adhäsion liegt. Es interagiert mit Mitgliedern der Integrin-Genfamilie sowie anderen

Membranproteinen. Es wird auf einer großen Anzahl hämatopoetischer Zellen und Gewebe exprimiert (Boucheix et al., 1991).

Decorin (*decorin*, DCN)

Decorin ist ein Proteoglykan, das in vielen Bindegeweben vorhanden ist (Danielson et al., 1993). In-Situ-Hybridisierungen mit einer decorinspezifischen Sonde in verschiedenen Embryonalstadien lassen bei Mäusen eine Rolle des Decorins bei epithelialen und mesenchymalen Interaktionen während der Organentwicklung vermuten (Scholzen et al., 1994).

Divalentes Eisentransportprotein 1 (*divalent metal transporter 1*, DMT1)

DMT1 ist der erste identifizierte Eisen-Transmembrantransporter. Er wird in nahezu allen Geweben exprimiert. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass DMT1 eine besondere Bedeutung bei der intestinalen Eisenabsorption und der Nutzbarmachung von Eisen für erythroide Zellen zukommt (Fleming et al., 1998; Fleming und Andrews, 1998).

Beta-1,4-Azetylgalaktosaminyltransferase (*beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase*, GALGT)

GALGT gehört zu den Gangliosiden, sialinsäurehaltigen Glykosphingolipiden, die in Signaltransduktion und Zell-Zellerkennung involviert sind.

Glyzerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (*glycerol-3-phosphate dehydrogenase*, GPD1)

GPD1 ist ein Enzym der Glykolyse.

Interferon γ (*interferon γ* , IFN γ)

Die antivirale Eigenschaft von Interferon wurde schon 1957 von Isaacs et al. erkannt. Das γ - oder immun-Interferon wird von T-Lymphozyten als Antwort auf Mitogene und Antigene produziert. Binder und Griffin (2001) beobachteten im Tiermodell, dass IFN γ die nichtzytolytische Vernichtung von Viren im Rückenmark und Hirnstamm vermittelt.

Somatomedin C (*insulin growth factor 1 or somatomedin C*, IGF1)

Woods et al. (1996) beschrieben, dass fötales Gewebe IGF1 sehr früh exprimiert und die Konzentration an IGF1 im fötalen Serum mit der Fetusgröße korreliert, auch wenn kein starker Einfluss von IGF1 auf das fötale Wachstum zu erkennen ist. Im Tiermodell zeigen IGF1-defiziente Mäuse eine gestörte Neuralentwicklung. Dies impliziert eine besondere Rolle

von IGF1 im Axonwachstum und bei dem Myelinisierungsprozess von Nerven. Semsarian et al. (1999) und Musaro et al. (1999) zeigten unabhängig voneinander, dass IGF1 eine Skelettmuskelhypertrophie verstärken kann.

Integrin beta 7 (*integrin beta 7*, ITGB7)

Die Integrine sind Teil einer großen Familie der Zelloberflächenglykoproteine, die eine Schlüsselrolle bei der Zelladhäsion und bei den extrazellulären Matrixproteinen einnehmen. Leukozyten exprimieren eine Reihe von Integrinen, die entscheidend an Entzündungsprozessen und Immunantworten mitwirken. Erle et al. (1991) postulierte für das Integrin beta 7 eine wichtige Rolle bei Adhäsionsinteraktionen von Leukozyten.

Laktalbumin alpha (*lactalbumin alpha*, LALBA)

Die starke strukturelle Ähnlichkeit von LALBA zu Lysozym lässt einen hohen Verwandtschaftsgrad dieser beiden Proteine vermuten. Laktalbumin zeigt jedoch keine bekannte enzymatische Tätigkeit. Es hat stattdessen Einfluss auf andere Enzyme in der Laktosesynthese (Dayhoff, 1972; Hall et al., 1987). Hakansson et al. (1995) fanden heraus, dass multimerisches alpha-Laktalbumin den Kalzium-Gehalt in der Milch anhebt und ein Apoptose-induzierendes Agens mit zytotoxischer Aktivität ist.

Lysozym (*lysozyme*, LYZ)

Lysozym katalysiert die Hydrolyse bestimmter Mukopolysaccharide (beta 1-4 glykosidische Bindung zwischen N-Azetylmuraminsäure und N-Azetylglukosamin) in bakteriellen Zellwänden. Eine starke Herabsetzung des normalen Lysozymlevels im Körper geht mit einer erhöhten Infektionsgefahr einher (Spitznagel et al., 1972). Camara et al. (1990) identifizierten beim Kaninchen zwei Isoformen des Lysozyms und zeigten deren gewebeabhängige Verteilung im Körper. Es konnten leukozytäre und gastro-intestinale Isozyme unterschieden werden, ein lymphozytäres Isozym wird angenommen.

Mastzell- (oder Stammzell-) faktor 1 (*mastcell (or stemcell) growth factor 1*, MGF1 (SCF1))

Der Stammzellfaktor ist beim Menschen als hämatopoetischer Wachstumsfaktor bekannt. Er spielt im Mausmodell zusätzlich eine entscheidene Rolle in der Entwicklung einiger Zelllinien während des embryonalen Entwicklungsstadiums. MGF1 verstärkt die Proliferation myeloischer und lymphoider Vorläuferzellen in Knochenmarkszellkulturen (Martin et al., 1990).

Hauptintrinsisches Protein (major intrinsic protein, MIP)

Das MIP der Okularlinsenfaser wird während der Zelldifferenzierung in der Okularlinse gebildet.

Kernfaktor 2 erythroider Genese, (*nuclear factor, erythroid derived*, NF-E2)

NF-E2 ist einer von drei essentiellen Regulatoren bei der Differenzierung von Megakaryozyten (Shivdasani, 2001). Unabhängig davon wird NF-E2 von Interleukin 4, einem Zytokin, das B-Lymphozyten stimuliert, beeinflusst (Catani et al., 2001).

Transkriptionsfaktor Y, B-Untereinheit (*nuclear transcription factor Y, B subunit*, NF-YB)

NF-Y ist ein Transkriptionsfaktor, von dem angenommen wird, essentiell für die Expression der MHC-Klasse-II-Gene beim Menschen zu sein. Der Transkriptionsfaktor NF-Y kann verschiedene Formen bilden, NF-YA und NF-YB. Beide sind notwendig für DNA-Bindung.

Neurotensin (*neurotensin*, NTS)

Neurotensin ist im zentralen Nervensystem weit verbreitet (Mai et al., 1987), Gerhard et al. (1989) konnten zeigen, dass sich dies auf die Katecholamin-haltigen Neurone beschränkt.

DNA-Polymerase, ϵ Untereinheit (*polymerase DNA, ϵ subunit*, POLE)

Die DNA-Polymerase-Untereinheit ϵ ist eine von mehreren DNA-Polymerasen in eukaryotischen Zellen. Es ist bei allen Säugern an Reparaturprozessen der DNA und bei der Replikation chromosomaler DNA beteiligt. Syvaoja (1990) zeigte u.a. das unterschiedliche Vorkommen der DNA-Polymerase- ϵ -Untereinheit gegenüber anderen DNA-Polymerase-Untereinheiten auf.

katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 1, γ Isoform (*protein phosphatase 1, catalytic subunit, γ isoform*, PPP1CC)

Northern-Blot-Analysen zeigten, dass PPP1CC-spezifische mRNA im menschlichen Herz, im Gehirn, in der Plazenta, in der Lunge, in der Leber, in der Skelettmuskulatur, in der Niere und im Pankreas vorhanden ist (Norman und Mott, 1994). PPP1CC ist im Tiermodell bei parthenogenetisch erzeugten Embryonen signifikant geringer exprimiert im Vergleich zu durch Fertilisation gezeugten Embryonen (Mann, 1995).

Primase 1 (*primase polypeptid 1*, PRIM)

Die Primase katalysiert die Synthese von Oligoribonukleotidprimern an der zu replizierenden DNA. Sie liefert der DNA-Polymerase α damit die Voraussetzung zur Synthese von DNA (Prussak et al., 1989).

nichtkatalytische, Adenin-Mono-Phosphat aktivierte Proteinkinase, Typ γ 1 (*protein kinase, Adenin-Mono-Phosphat (AMP) activated, noncatalytic, γ 1*, PRKAG1)

Diese AMP-aktivierte Proteinkinase besteht aus einer katalytischen α und den nicht-katalytischen β - und γ -Untereinheiten. Die Proteinkinase arbeitet als metabolischer Sensor für den AMP-Spiegel in den Zellen (Stapleton et al., 1997).

Protein-Tyrosinphosphatase, Rezeptortyp beta (*protein-tyrosin phosphatase, receptor type beta*, PTPRB)

PTPRB dephosphoryliert O-Phosphotyrosingruppen in Phosphoproteinen.

Hemmprotein 2 der Zytokinsignalkette (*suppressor of cytokine signaling 2*, SOCS2)

SOCS2 interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne des IGF1 Rezeptors. Dey et al. (1998) schlossen daraus, dass die SOCS2 Proteine eine regulatorische Funktion in der IGF1-Kaskade innehaben. Metcalf et al. (2000) zeigten im Tiermodell, dass ein Mangel an SOCS2 nach Abschluss der Entwöhnung vom Muttertier im Jungtier ein verstärktes Wachstum bewirkt. Bei SOCS2-defizienten Tieren sind neben der Zunahme der Knochenlänge, der Muskel- und Knochenanteil signifikant höher als beim Wildtyp.

Synaptobrevin 1 (*synaptobrevin 1*, SYB1)

Synaptobrevin1 ist ein kleines integrales Membranprotein, das spezifisch auf synaptischen Vesikeln in Neuronen exprimiert ist.

Uracil-DNA-Glykosilase (*uracil DNA glycosylase*, UNG)

Die Uracil-DNA-Glykosilase ist ein DNA-Reparaturenzym, welches Uracil aus der DNA entfernt. Nilsen et al. (2000) zeigten jedoch im UNG-knockout-Tiermodell, dass die UNG-defizienten Tiere keine höhere Mutationsfrequenz haben. Die Autoren vermuten, dass das Enzym speziell beim Austausch von Uracil gegen Thymin aus Uracil-Adenin-Basenpaaren während der DNA-Synthese eingesetzt wird.

Vitamin-D-Rezeptor (*vitamin D receptor*, VDR)

VDR gehört in die Familie der transaktiven transkriptionalen Regulationsfaktoren, in die auch die Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren gehören. Yoshizawa et al. (1997) zeigte im Tiermodell, dass VDR-defiziente Tiere während ihrer Entwicklung bis zu dem Zeitpunkt der Entwöhnung vom Muttertier keine Defekte zeigten, unabhängig vom Ausmaß des Mangels an VDR. Nach der Entwöhnung jedoch zeigten sich Unterschiede: Tiere ohne ausreichende Menge an VDR entwickelten eine Alopezie, eine Kalziumunterversorgung und Sterilität, z.T. einhergehend mit Knochendeformationen.

Von-Willebrand-Faktor (*von Willebrand factor*, VWF)

Der von-Willebrand-Faktor zirkuliert im Blutplasma und ist an Gefäßwänden sowie in Thrombozyten zu finden. Er führt zur Adhäsion von Thrombozyten untereinander sowie mit der Gefäßwand und dient als Stabilisator des Blutgerinnungsfaktors VIII, der ohne den von-Willebrand-Faktor schnell wieder abgebaut wird.

Zyklin-T (*cyclin T*, CCNT1)

Wei et al. (1998) isolierten dieses dem Zyklin-C verwandte Protein, das spezifisch mit der Transaktivierungsdomäne von Tat (ein zur viralen Transkription notwendiges Protein) interagiert. Northern-Blot-Analysen zeigten, dass CCNT1 im humanen Gewebe weit verbreitet ist.

Zyklin-abhängige Kinase 2 (*cyclin dependent kinase 2*, CDK2)

Zykline sind regulatorische Untereinheiten, die als Komplexe mit Kinasen wichtige Schritte im Zellzyklus kontrollieren (Tsai et al., 1991). In humanen Endothelzellen ist der Apoptosevorgang nach Entzug von Wachstumsfaktoren mit der Hochregulation von Zyklin-A-abhängiger CDK2-Aktivität assoziiert (Jeffrey et al., 1995).

2.2.2 Erstellen rinderspezifischer Oligonukleotidprimer

Oligonukleotidprimer zur Amplifikation einiger Genfragmente wurden direkt von bekannten Rindersequenzen abgeleitet. Bei anderen Genfragmenten wurden die Primer zunächst von den Exonsequenzen, die beim Menschen, der Maus oder anderer Säugetieren bekannt sind, abgeleitet. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer möglichst an zwei aufeinander folgenden Exons binden, um eine Mindestfragmentgröße von 150 Basenpaaren zu erhalten. Diese Fragmentgröße ermöglicht Standard-PCR-Bedingungen.

2.2.2.1 Quantifizierung der Oligonukleotidprimer

Oligonukleotide, die mit Hilfe des DNA-Syntheseautomaten des Bernhard-Nocht-Institutes synthetisiert wurden, lagen in destilliertem Wasser gelöst vor. Zur Quantifizierung der Oligonukleotide wurde die optische Dichte der Oligonukleotidlösungen bei einer Wellenlänge von 260nm (OD₂₆₀) spektralphotometrisch gemessen und aus dem Messwert deren Konzentration errechnet. Anschließend wurden 10mM Gebrauchslösungen der Oligonukleotide für den Einsatz als Primer in PCRs hergestellt.

Oligonukleotidprimer der Firmen MWG und Gibco/life technologies waren bereits bei Lieferung quantifiziert und lyophilisiert. Nach Herstellerangaben wurde nach Zugabe von ddH₂O eine 100mM Stammlösung der Oligonukleotide erstellt und diese zum Gebrauch auf eine Konzentration von 10pmol/μl verdünnt.

2.2.2.2 Überprüfung der Spezifität der Oligonukleotidprimer

Die PCR-Produkte, die nach Amplifikation boviner DNA mit den entsprechenden Primerpaaren erhalten wurden, wurden durch Sequenzierung und anschließenden Vergleich durch das Internetprogramm *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Algorithmus (Altschul et al., 1990) mit bekannten und veröffentlichten DNA-Sequenzen in den Datenbanken NCBI und EMBL analysiert. Stimmt die Exonbereiche mit den Ausgangssequenzen von Mensch o.a. bekannten Säugern überein, wurde angenommen, dass das richtige Genprodukt mit den Primern amplifiziert wurde. Zur Spezifizierung der Primer wurden erneut Oligonukleotide von den nun vorliegenden bovinen Sequenzen abgeleitet.

2.2.3 Standard-Polymeraseketten-Reaktion

In der Polymeraseketten-Reaktion (PCR) wird ein definierter Abschnitt auf der DNA in vitro enzymatisch vervielfältigt. Zwei sequenzspezifische Oligonukleotidprimer flankieren den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt und dienen als Ansatzort für die Polymerase, die die Primer verlängert und so ein Amplifikat dieses DNA-Abschnittes liefert.

Ein Zyklus besteht aus drei Teilschritten:

Der DNA-Doppelstrang wird bei 94°C aufgetrennt (Denaturierung). Primer lagern sich bei für sie spezifische Temperaturen an die komplementären Regionen der beiden Einzelsträngen an (Annealing). Die anschließende Kettenverlängerung findet bei 72°C statt, wobei sich Nukleotide mit Hilfe der DNA-Polymerase vom 3'-Ende der Primer ausgehend an die Einzel-

stränge anlagern und miteinander verknüpft werden (Extension). Die neu gebildeten Doppelstränge dienen nach erneuter Denaturierung als Matrize für die nächsten Zyklen.

Das Gesamtvolumen des Standard-PCR-Ansatzes betrug 10 bis 50 μl , abhängig von der Zielsetzung des Ansatzes.

Ein 10 μl Reaktionsansatz enthielt:

- 10ng genomische Matrizen-DNA
- je 75ng der einzusetzenden Primer
- 10mM Tris-HCl, pH 8,3; 50mM Kaliumchlorid; 1,5 mM Magnesiumchlorid; 0,001% Gelatine
- jeweils 200 μM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (HYBAID-AGS)
- 0,1 unit *Taq*-Polymerase (Pharmacia)

Um Kontaminationen bei den eingesetzten Reagenzien mit Fremd-DNA auszuschließen, enthielten Ansätze für die Negativkontrolle keine Matrizen-DNA.

Die PCRs wurden in automatischen Thermocyclern durchgeführt (MWG, Biometra, Omnigene). Die Reaktionsansätze wurden zunächst für 4 min bei 94°C denaturiert. Die Annealing- und Extensionsbedingungen wurden entsprechend der Basenzusammensetzung und Länge der Primer sowie der Länge der zu amplifizierenden DNA-Fragmente eingestellt (Bedingungen der Primerkombinationen: siehe Kapitel 7.2). Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen.

2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten

Zur Kontrolle und Analyse von PCRs wurden die PCR-Produkte auf ein mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel aufgetragen, um die Länge der amplifizierten Produkte zu bestimmen. Nukleinsäuremoleküle wandern aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrates im elektrischen Feld und lassen sich deshalb ihrer Länge nach im Agarosegel auftrennen.

Je nach Größe des zu gießenden Gels und des gewünschten Trennbereiches wurden zwischen 50 und 250ml TBE-Puffer (einfach konzentriert) zusammen mit der entsprechenden Menge Agarose aufgeköcht, um zwischen 1 und 2%ige Agaroselösungen zu erhalten. Hohe Agarosekonzentrationen in einem Gel bewirken eine Verkleinerung der Porengröße, was kleinen PCR-Fragmenten ein schnelleres Wandern im Gel ermöglicht als großen Fragmenten.

Die Agaroselösungen wurden auf 60°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml) versetzt und in den Gelträger für horizontale Elektrophoresekammern gegossen. Die PCR-Produkte wurden mit Ladepuffer versetzt und vollständig auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einfach konzentriertem TBE-Puffer in Flachbrett-Elektrophoresekammern bei einer Spannung von 5Volt/cm Gellänge. Zur Längenbestimmung der PCR-Fragmente wurden DNA-Längenstandards eingesetzt. Durch anschließende UV-Bestrahlung des Gels wurden die PCR-Fragmente aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

Von größeren Reaktionsansätzen wurden 5µl PCR-Produkt abgenommen, mit Ladepuffer auf einem Kontroll-Agarosegel aufgetragen und die Ergebnisse dokumentiert. Der verbleibende Restansatz wurde für weitere Analysen wie Klonierungen oder Sequenzierungen verwendet.

2.2.3.2 Aufreinigung des PCR-Produktes

Die PCR-Produkte wurden auf spezielle Sammelsäulen der Firma Roche aufgetragen, deren Glasfibrermembranen nur DNA-Fragmente mit einer Mindestlänge von 100bp binden (High Pure PCR Product Purifikation Kit, Roche). Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Während der Waschvorgänge wurde das PCR-Produkt von Primern, Nukleotiden und anderen Pufferkomponenten gereinigt. Danach wurde das PCR-Produkt mit einem wenig Salze enthaltenden Puffer eluiert und stand für weitere Untersuchungen wie Sequenzierungen direkt zur Verfügung.

Zur Kontrolle des DNA-Gehalts des PCR-Produktes wurden 3µl des aufgereinigten PCR-Produktes auf ein mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel aufgetragen. Anhand der Intensität der Fluoreszenz des PCR-Produktes im Vergleich zum Längenstandard wurde der DNA-Gehalt grob abgeschätzt und dokumentiert.

2.2.4 Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Produkten

Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem „BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems, ABI) durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch Methode (Sanger et al., 1977). Die Methode basiert auf der Neusynthese von DNA an einer einzelsträngigen Matrize. Basenspezifische Didesoxynukleotide werden bei der Neusynthese zufällig eingebaut, wodurch es zu einem Abbruch der Synthese kommt. Die Didesoxynukleotide sind mit fluoreszierenden chemischen Gruppen versehen, den Fluorophoren. Die Verwendung der vier verschiedenen Fluorophore

dichloro[R110] BigDye, dichloro[ROX] BigDye, dichloro[R6G] BigDye und dichloro[TAMRA] BigDye zum Markieren der Nukleotide ermöglicht, dass die Sequenzierreaktion in einem Reaktionsansatz ablaufen kann. Das anschließend aufgereinigte Produkt dieses Ansatzes wird auf einer Gelspur im Polyacrylamidgel aufgetragen.

Die Aufreinigung der Proben nach der Sequenzierreaktion erfolgte nach Angaben von Applied Biosystems.

Amplifikate von Primerkombinationen, bzw. Produkte von Primern, deren Sequenzen nicht aus Publikationen entnommen wurden, wurden zur Kontrolle sequenziert. Sofern diese Überprüfung das gewünschte PCR-Produkt bestätigte, und die Primer spezifisch für Rindersequenzen waren, wurden die Primer für weitere Analysen eingesetzt.

Primer, die von Gensequenzen des Menschen, der Maus oder anderen Säugern abgeleitet wurden, liegen in konservierten Exonbereichen und kreuzhybridisieren deshalb oft mit der DNA verschiedener Spezies. Mit Hilfe von Sequenzierreaktionen wurden die Amplifikate solcher Primerkombinationen und der DNA verschiedener Spezies überprüft: Der Vergleich der Sequenzen ermöglichte es, rinderspezifische Primer herzustellen.

Sofern die rinderspezifischen Primerkombinationen für PCR-Analysen in den verschiedenen Zelllinienhybriden zum Einsatz kamen, bzw. wenn es sich um neue, bisher unbekannt Sequenzen handelte, wurde zusätzlich die Rinder-DNA der Großelterngeneration des Zuchtprogramms im ILRI / Kenia mit diesen Primern amplifiziert und sequenziert.

2.2.4.1 Sequenzierreaktionen

Die Kontrolle auf den DNA-Gehalt des Ausgangsproduktes im Agarosegel gab nach Aufreinigung des PCR-Produktes Aufschluß darüber, welche Menge als Matritze für die Sequenzierreaktion eingesetzt werden mußte. Je nach Länge des zu sequenzierenden PCR-Produktes wurde die Einsatzmenge des BigDyeTMMixes variiert. Bei einer Fragmentlänge von ca 100 bis 400bp wurden 4µl BigDyeTMMix eingesetzt, bei längeren PCR-Produkten entsprechend mehr. Der von Applied Biosystems empfohlene Einsatz von 8µl wurde nur bei Fragmentlängen von über 800bp eingesetzt.

Beim Sequenzieren erfolgen die PCRs mit den fluoreszierenden Nukleotiden für die an den unterschiedlichen Strängen der DNA anlagernden Primer in getrennten Ansätzen.

Reaktionsansatz:

- 100ng PCR-Produkt
- 10pmol Primer
- 4 – 8µl BigDye™Mix
- ad 20µl H₂O

Reaktionsbedingungen:

96°C	2 min	Denaturierung	} 25 Zyklen
96°C	30 sec	Denaturierung	
50°C	15 sec	Primeranlagerung	
60°C	4 min	Amplifikation	
4°C	Programmende, Lagerungstempertatur		

2.2.4.2 Aufreinigung der Sequenzierreaktion

1. 20µl Sequenzierreaktion mit 80µl aqua dest, 10 µl 3M Natriumazetat-Lösung (pH 5,2) und 25µl absoluten Ethanol versetzen
2. 15 min bei 14000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen
3. 250µl 70%igen Ethanol dazugeben
4. 5 min bei 14000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen
5. Sediment bei 37°C trocknen
6. Sediment in 4µl Formamid/EDTA-Ladepuffer lösen

Je 1,5µl Sequenzierreaktion/Ladepuffergemisch wurden auf ein Polyacrylamidgel (bestehend aus Acrylamis und Bis-Acrylamid, die durch die Zugabe von 10%igem Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED polymerisieren und dadurch ein Netzwerk bilden) aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese lief je nach der Gesamtfragmentlänge des sequenzierten PCR-Produkts 8 bis 10 Stunden.

Die Sequenzanalyse erfolgte mit einem automatisiertem Nachweissystem in einem Sequenziergerät (377 DNA-Sequencer[®] Applied Biosystems).

2.2.4.3 Sequenzvergleich und Homologieanalysen

Bei dem Sequenzvergleich wurden zwei oder mehr Sequenzen im SequenceEditor-Programm (SeqEd V 1.0.3[®] Applied Biosystems) gegenübergestellt und deren Basensequenz verglichen. Das Ziel dieser Analyse war, die Ähnlichkeit der Sequenzen zu ermitteln. Durch die Gegenüberstellung ließen sich homologe und nicht-homologe Sequenzabschnitte unterscheiden.

2.2.4.4 Datenbanksuche

Sequenzhomologieanalysen gegen alle bisher analysierten DNA-Sequenzen in Datenbanken ließen Rückschlüsse über das sequenzierte Fragment zu. Sequenzhomologien zwischen einer bisher unbekanntem Sequenz einer Spezies und einer bekannten Sequenz einer anderer Spezies ermöglichten die Zuordnung der neuen Sequenz in Bezug auf eine mögliche Funktion der Sequenz.

2.2.4.5 Sequenzstruktur- und Motivanalyse

Befanden sich in einer Sequenz sich mehrfach wiederholende Abschnitte (*tandem repeats*), konnte dieser Mikrosatellit zur Genotypisierung der Rinderpopulation verwendet werden, sofern seine Allele in der F₀-Generation zwischen den suszeptiblen und trypanotoleranten Tieren unterscheidbar waren.

2.2.4.6 Analyse des Informationsgehaltes von DNA-Sequenzen

Die Bedeutung eines Basenaustausches in einer kodierenden DNA-Sequenz bzw. in einem Gen wurde durch die Übersetzung der Basensequenz in die Aminosäuresequenz ersichtlich. Die Suche in kodierenden Abschnitten der Sequenz begann mit der Analyse von „offenen Leserastern“ (längere Sequenzabschnitten ohne Stopcodons) des genetischen Codes innerhalb der zu analysierenden Sequenz.

2.2.5 PCR-Analysen der Hybrid-Zelllinien-DNA

(SCH-Panel, BovRH5- und BovRH12-Panel)

Die PCR-Analysen des SCH-Panels und des BovRH5-Panels wurden in Thermo-Fast®48-PCR-Mikrotiterplatten (Firma ABgene) in PCR Maschinen (Biometra) durchgeführt. Es wurde mit Ansätzen von 15µl gearbeitet. Aufgrund der hohen Anzahl der DNA-Proben des BovRH12-Panels wurden diese PCR-Ansätze auf 384well-Mikrotiterplatten (Whatmann) in entsprechenden PCR-Maschinen (MWG) durchgeführt. Zwei Marker und/oder Genfragmente wurden bei gleichen Temperaturbedingungen in einem Ansatz von 10µl amplifiziert (Multiplex-PCR).

Für jeden Marker wurden zweimal unabhängig voneinander PCR-Ansätze an verschiedenen Tagen durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit Ladepuffer versetzt und zur Kontrolle mit einem Längenstandard auf einem mit Ethidiumbromid versetzten 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Lauf wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Die positiven und negativen Signale beider Ansätze wurden miteinander

verglichen. Voneinander abweichende Ergebnisse erforderten eine Wiederholung der entsprechenden Experimente.

Das SCH-Panel wurde für die Amplifikation von Genfragmenten eingesetzt, deren Positionen im Rindergenom noch nicht bekannt waren. Die Positivsignale der einzelnen DNA-Proben des SCH-Panels wurden tabellarisch aufgelistet und zur Analyse an Johnson (Texas A&M University, USA) geschickt. Die Analyse gab Aufschluß über die Chromosomen, auf denen die Genfragmente liegen.

Die DNA-Proben des BovRH5-Panels wurde für alle Marker und Genfragmente eingesetzt, von denen bekannt war, dass sie auf dem Chromosom *BTA5* liegen. Die DNA-Proben des BovRH12-Panels wurde nur für die Marker und Genfragmente eingesetzt, die in der Region des QTL auf dem Chromosom *BTA5* lagen. Alle Positiv- und Negativsignale wurden tabellarisch dokumentiert und für weitere statistische Analysen verwendet.

2.2.6 Ligation und Transformation von PCR-Produkten aus der chromosomensegment-spezifischen Bibliothek

Die von Goldammer zur Verfügung gestellten PCR-Produkte der chromosomenfragment-spezifischen Bibliothek wurden in einen Vektor (pPCR-Script AMP SK(+), Stratagene) ligiert und anschließend in *Escherichia coli*-Zellen kloniert. In den Bakterien wird die Fremd-DNA zusammen mit dem Plasmid unabhängig vom Wirtsgenom vermehrt.

2.2.6.1 Glättung der PCR-Amplifikatenden und deren Ligation

Der zur Klonierung eingesetzte Vektor pPCR-Script AMP SK(+) setzt glatte Enden des PCR-Produktes voraus. Dazu wurden die einzusetzenden PCR-Produkte mit der *Pfu*-DNA-Polymerase, einem korrekturlesenden Enzym mit 3'→5' Exonuklease- ohne terminale Transferaseaktivität vorbehandelt. Da die 3'→5' Exonukleaseaktivität bei diesem speziellen Enzym des PCR-Script™ Amp Cloning Kits (Stratagene) stark eingeschränkt ist, dient das Enzym nur der einfachen Kopierung der Matrizen-DNA und der Glättung der PCR-Produktenden.

Vorbehandlung des PCR-Produktes mit *Pfu*-DNA-Polymerase (nach Herstellerangaben):

- 10µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1µl 10mM dNTP (2,5 mM je Nukleotid)
- 1,3µl 10fach Puffer (*polishing buffer*, 10fach)
- 0,5U *Pfu*-DNA-Polymerase

Der Reaktionsansatz wurde mit Öl überschichtet und für 30 min bei 72°C im Wasserbad inkubiert. Das geglättete PCR-Produkt konnte direkt in den Ligationsansatz gegeben werden. Kurzzeitige Lagerung bei 4°C war möglich.

Zur Ligation wurde das Enzym T4 DNA-Ligase eingesetzt. Dieses Enzym katalysiert die Verknüpfung von zwei DNA-Enden, die über die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphatrest und einer 3'-Hydroxylgruppe erfolgt.

Das Enzym *Srf*I erkennt die einmal im Vektor vorhandene Sequenz GCCCGGGC und produziert beim Schneiden glatte Enden. Das mit der *Pfu*-DNA-Polymerase vorbehandelte PCR-Produkt wurde mittels der T4-DNA-Ligase eingebaut.

Ligationsansatz (nach Herstellerangaben; Reagenzien aus dem PCR-Script™ Amp Cloning Kit, Stratagene):

- 1µl pPCR-Script AMP SK(+) Vektor (10ng/µl)
- 1µl PCR-Script 10fach Puffer
- 0,5µl 10mM ATP
- 1µl *Srf*I-Restriktionsenzym (5U/µl)
- 1µl T4-DNA-Ligase (4U/µl)
- 2µl geglättetes PCR-Produkt

auffüllen mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 10µl

Der Reaktionsansatz wurde durchmischt und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 10 min auf 65°C erhitzt und bis zum Einsatz bei der Transformation auf Eis gelagert. Nicht sofort benötigte Reste konnten bei –20°C gelagert werden und standen für weitere Transformationen zur Verfügung.

Entsprechend präparierte Bakterien wurden anschließend mit dem um das PCR-Amplifikat erweiterte Plasmid transformiert.

2.2.6.2 Transformation von E. coli-Zellen

Epicurian Coli XL10-Gold ultrakompetente Zellen (Stratagene) sind sehr empfindlich und die Ausbeute an transformierten Zellen ist abhängig von der Behandlung während der Transformation. Deshalb wurde strikt nach Herstellerangaben gearbeitet. Transformiert wurden die im vorherigen Schritt vorbereiteten Plasmide, deren Insert aus den PCR-Amplifikaten der chromosomenfragmentspezifischen Bank von Chromosom *BTA5* bestand.

Abschließend wurden je 100µl Transformationsansatz auf LB-Agar-Platten (versetzt mit 100mg/ml Ampicillin für Plasmidselektion, sowie 40mg/ml X-Gal und 400µg/ml IPTG für

Blau-/Weißselektion auf das Plasmidinsert) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von allen weissen Kolonien wurden „gekochte Klone“ angefertigt, d. h., die Klone wurden mit sterilen Pipettenspitzen angepickt, und die Pipettenspitzen wurden anschließend in Eppendorfgefäße (1,5ml) mit je 500µl aqua dest. gegeben. Nach 5-minütigem Erhitzen auf 95°C und Abzentrifugieren von Bakterienproteinen lag die DNA der Zellen in dem destillierten Wasser gelöst vor. Von den Überständen wurden 5µl als DNA-Matrize in 50µl-PCR-Ansätzen mit vektorspezifischen, die Insertstelle flankierenden M₂₄-Primern eingesetzt. Um die Fragmentgrößen der PCR-Produkte zu bestimmen, wurden je 3µl der PCR-Ansätze auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Der das Insert flankierende Vektoranteil betrug 228 Basenpaare inklusive der 48 Basenpaare für die Primer. Für den weiteren Verlauf wurden nur die PCR-Produkte (und somit Klone) verwendet, deren Inserts größer als 150 Basenpaare (bp) waren, also jene PCR-Produkte, die im Agarosegel eine Bande bei ca 400bp und größer zeigten.

Von diesen ausgewählten PCR-Produkten wurden 5µl für einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *XhoI* (3 units/5µl PCR-Produkt) eingesetzt. *XhoI* schneidet im flankierenden Vektoranteil sowie in den degenerierten Primern, die beim Erstellen der chromosomenfragmentspezifischen Bank eingesetzt wurden. PCR-Produkte, deren Inserts aus den Ketten degenerierter Primer bestanden, wurden verdaut und zeigten nach Auftragen des Verdauansatzes auf ein 1,5%iges Agarosegel Banden, die 100 Basenpaare und kleiner waren.

Von den so vorselektierten Plasmidinserts wurden die verbleibenden 40µl der PCR-Produkte zum Sequenzieren mit einem Reinigungs-Kit (siehe Kapitel 2.2.3.2) aufgereinigt.

Die Bandenstärke der aufgereinigten Proben auf einem 1,5%iges Agarosegel gab die Einsatzmenge des Produktes als Matrize für die Sequenzierreaktion vor.

Nach dem Sequenzieren wurden beim Auswerten der Sequenzen im SequenceEditor-Programm die Vektoranteile der Gesamtsequenz abgeschnitten und damit reine Insertsequenzen erhalten. Diese wurden mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) *Algorithmus* (Altschul et al., 1990) der NCBI-Datenbank mit bekannten und veröffentlichten DNA-Sequenzen weiterer Datenbanken analysiert. Wenn keine Übereinstimmungen gefunden wurden, wurde davon ausgegangen, dass es sich um bisher nicht veröffentlichte und unbekannte Rindersequenzen handelte. Von diesen neuen Sequenzen wurden Primer abgeleitet, mit denen die Rinder-DNA der BovRH5- und BovRH12-Panels amplifiziert wurde.

Zusätzlich wurden diese neuen Sequenzen bei den Großelterntieren des Zuchtprogramms im ILRI/Kenia auf Nukleotidunterschiede zwischen N'Dama- und Boran-Rindern hin untersucht.

2.2.7 Statistische Analyse der Daten der Hybrid-Zelllinienkonstrukte

(SCH-Panel, BovRH5- und BovRH12-Panel)

Die Datenanalyse der PCR-Ergebnisse aus dem SCH-Panel wurde von Johnson im Labor von Womack (Texas A&M University, USA) durchgeführt.

Alle positiven und negativen PCR-Signale der BovRH5- und BovRH12-Panels wurden in tabellarischen Form dokumentiert und mussten mit Hilfe eines Konvertierprogramms (<http://corba.ebi.ac.uk/RHdb/Clients/ScoresFormat.html>) in das für das RHMAP-Computerprogramm erforderliche Format überführt werden.

Gruppen aus mehreren miteinander gekoppelten Loci wurden mit Hilfe der 2-Punkt-Analyse (RH2pt) identifiziert, wobei unterschiedlich hohe Lodscores (Lodscore 4,00; Lodscore 6,00 und Lodscore 8,00 etc) als Kriterien angenommen wurden.

Die Anzahl der positiven PCR-Signale pro Marker gibt Aufschluss über die Bruchfrequenz des Chromosoms (*retention frequency*). Unterschiedliche Bruchfrequenzen bei Chromosomen erfordern verschiedene Bruchfrequenzmodelle als Grundlage für die weitere statistische Analyse. Auf dem Chromosom *BTA 5* zeigten alle Marker eine gleichmäßige Anzahl an positiven PCR-Signalen. Für die weiteren Analysen wurde deshalb das Bruchfrequenzmodell „gleichförmig“ (*equal*) zugrunde gelegt.

Die wahrscheinlichste Anordnung der Loci innerhalb dieser Gruppen wurde mit Hilfe des Programms RHMaxLik errechnet. Dieses Programm kalkuliert Wahrscheinlichkeiten für die Locus-Anordnung eines jeden einzelnen Hybrids anhand aller beobachteten Chromosomenbrüche des gesamten Zelllinienkonstruktes (Boehnke et al., 1991). Dabei erfolgt die Anordnung der Loci schrittweise („stepwise“-Modus des Programms RHMaxLik, *maximum likelihood*). Jeder Locus aus der mit der 2-Punkt-Analyse (RH2pt) ermittelten Kopplungsgruppe wird einzeln zu bereits angeordneten Loci dieser Gruppe addiert. Nach jeder Addition wird die höchste Wahrscheinlichkeit für diese neue Anordnung errechnet. Jede Anordnung, deren Wahrscheinlichkeit einen vorher definierten Schwellenwert erreicht oder überschreitet, dient dann als Ausgangsgruppe für die Addition eines weiteren Locus. Für jede der Kopplungsgruppen wurde mittels RHMaxLik ein Rahmenwerk erstellt, wobei die Wahrscheinlichkeit der Anordnung innerhalb des Rahmenwerks mindestens 1000fach höher als die Wahrscheinlichkeit der nächstbesten Ordnung ist. Diese 1000fach höhere Wahrscheinlichkeit entspricht logarithmiert einem Lodscore von 3, welcher als hinreichende Wahrscheinlichkeit für Kopplung zwischen zwei Loci gilt (Boehnke et al., 1991). Loci, die nicht innerhalb der

Kopplungsgruppen lagen, wurden mit der notwendigen Reduktion der Stringenz der Kalkulationsbedingungen addiert.

Alle Kopplungsgruppen wurden abschließend zu einer gesamten Karte zusammengefasst. Relative Positionen und die Orientierung einzelner Loci zueinander wurden mit Hilfe der analysierten Daten des BovRH5- und BovRH12-Panels bestimmt. Dabei wurden die ermittelten Anordnungen der Loci einer Kopplungsgruppe als Grundlage für die Addition weiterer Loci der anderen Kopplungsgruppen genommen. Auch hier wurde das Programm RHMaxLik unter der Bedingung der wahrscheinlichsten Anordnung der Loci von 1000:1 angewendet.

2.2.8 BAC-Bank-Sichtung und Weiterverarbeitung der erhaltenen BAC-Klone

Ein künstliches Bakterienchromosom (BAC) ist ein Vektor, der Fragmente bis zu einer Länge von 300kb aufnehmen kann. BACs sind zirkuläre Moleküle, die von Bakterien vermehrt werden und gut zu isolieren sind.

Die bovine BAC-Bank Nr.750 des RZPDs (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) besteht aus 45 Primärpools, die je 3072 individuelle Klone enthalten, und jeder Primärpool aus mehreren Sekundärpools, die mit Hilfe von PCRs durchgemustert werden können. Die Bank ist so aufgebaut, dass positive PCR-Signale in einem Primärpool auf bestimmte Sekundärpools verweisen. Positive Signale im Sekundärpool wiederum geben den Mitarbeitern des RZPDs Aufschluss über den Einzelklon der Bank. Dieser Einzelklon wird auf Anforderung isoliert, angezüchtet und als Kolonie zur Verfügung gestellt.

Auf folgende Genfragmente wurde die bovine BAC-Bank mit Hilfe von PCRs durchgemustert:

- nichtkatalytische, Adenin-Mono-Phosphat aktivierte Proteinkinase, Typ $\gamma 1$ (*protein kinase, Adenin-Mono-Phosphat (AMP) activated, noncatalytic, $\gamma 1$, PRKAG1*)
- Protein-Tyrosinphosphatase, Rezeptortyp beta (*protein-tyrosin phosphatase, receptor type beta, PTPRB*)
- Vitamin-D-Rezeptor (*vitamin D receptor, VDR*)
- Zyclin-T (*cyclin T, CCNT1*)

Alle Einzelklone wurden vom RZPD isoliert und angezüchtet. Sie wurden in Form von *E. coli*-DH10B-Kolonien mit Chloramphenicol-Resistenz geliefert. Die erhaltenen Kolonien wurden auf LB-Chloramphenicol-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C

inkubiert. Die neu gewachsenen Kulturen dienten zum Animpfen von LB-Chloramphenicol-Medium und zur Anzucht von Übernachtskulturen bei 37°C im Schüttler.

Die auf LB-Chloramphenicol-Agar ausgestrichenen Kolonien wurden bei 4°C gelagert.

Die BACs wurden am folgenden Tag mit dem NucleoBond BAC 100 Kit (Macherey-Nagel) isoliert und aufgereinigt. Um die rekombinanten Plasmide in den Bakterien zu isolieren, mussten die strukturellen Bestandteile und die genomische DNA der Bakterien entfernt werden. Die Zellen wurden durch das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulphat) aufgeschlossen. Zellrückstände wurden durch Filtration von der DNA getrennt und die RNA durch RNase-Behandlung zerstört. Alkalische Lösungen bewirken, dass die Phosphatgruppen der DNA negativ geladen sind und an Anionenaustauschersäulen, die aus einer Silika-Matrix mit positiv geladenen Gruppen bestehen, binden. Proteine sind weniger stark geladen und binden weitaus schwächer. Mit Puffern hoher Ionenstärke wurde die DNA eluiert und anschließend mit Alkohol gefällt, um den hohen Salzgehalt aus der DNA-Lösung zu entfernen.

2.2.9 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Bei der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung werden Metaphasechromosomen mit fluoreszenzmarkierten Sonden hybridisiert. Für ein eindeutig identifizierbares Signal sollte die Sonde, die durch Nicktranslation mit Biotin-16dUTP (desoxy-Uracil-Tri-Phosphat) markiert wird, aus einem DNA-Fragment von mindestens 1kb Länge bestehen. Der für den Nachweis verwendete mit Fluorochrom (hier: Fluoreszein-x-Isothiocyanat, FITC,) markierte Anti-Avidin-Antikörper bindet an das an Biotin gebundene Avidin und erscheint später im Fluoreszenzmikroskop als helles Signal, während die Chromosomen mit einer Gegenfärbung (hier: Propidium-Jodid) sichtbar gemacht werden, die auch die Identifizierung der einzelnen Chromosomen zulässt (Goldammer et al., 1996).

Diese Nachweise wurden 2001 von Brunner in der Arbeitsgruppe von Schwerin in Dummerstorf durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die Sonden dienten die mittels PCR isolierten und aufgereinigten BAC-Klone der bovinen BAC-Bank.

2.2.10 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analysen von PCR-Produkten

Wurden beim Screening der sequenzierten PCR-Produkte von N'Dama- und Boran-Rindern Sequenzunterschiede wie Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotid polymorphism*, SNP) gefunden, wurden daraufhin die Familien auf diese Sequenzunterschiede mit PCR-RFLP-Analysen untersucht.

Die Sequenz des PCR-Produkts wurde dazu in das Computerprogramm DNASIS eingegeben und zur Detektion des Polymorphismus ein allelspezifisch an der fraglichen Stelle schneidendes Restriktionsenzym gesucht.

Das entsprechende PCR-Produkt wurde daraufhin bei allen Tieren der Familien amplifiziert und unter den für das Restriktionsenzym spezifischen Bedingungen verdaut.

Das Ansatzvolumen für den Restriktionsverdau betrug 10µl, wobei zwischen 3 und 6µl PCR-Produkt von 1 bis 2 units des Enzyms verdaut wurden. Der gesamte Ansatz wurde mit Lade-puffer versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend analysiert.

Folgende Restriktionsenzyme wurden eingesetzt:

Tabelle 2-1:

Verwendete Restriktionsenzyme mit der für sie spezifischen Sequenz, die sie in der zu zerschneidenden DNA erkennen. Die Pfeile (▲) markieren die Schnittstellen des jeweiligen Restriktionsenzymes. C=Cytosin, G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, W=Adenin oder Thymin

Enzym	Erkennungssequenz
<i>StyI</i>	5'...C▲CWWGG...3'
<i>Fnu4HI</i>	5'...GC▲NGC...3'
<i>PstI</i>	5'...CTGCA▲G...3'
<i>NcoI</i>	5'...C▲CATGG...3'
<i>RsaI</i>	5'...GT▲AC...3'
<i>BsrI</i>	5'...ACTGGN▲...3'

2.2.11 Fragmentlängenbestimmung von Mikrosatelliten-Allelen

Zur Bestimmung der Genotypen an einem Genort müssen die Fragmentlängen der Allele nach PCR-Amplifikation analysiert werden. Die Fragmentlängen der Mikrosatelliten-PCR-Produkte liegen im Durchschnitt zwischen 100 und 300bp. Da sich die Größe zweier Allele eines Locus um nur zwei Basenpaare unterscheiden kann, ist zu ihrer Analyse eine gelelektrophoretische Auftrennung im hochauflösenden denaturierenden Acrylamidgel notwendig.

Der PCR-Ansatz enthielt neben der genomischen Matrizen-DNA, den 4 dNTPs und der *Taq*-DNA-Polymerase jeweils einen fluoreszenzmarkierten und einen unmarkierten Primer. Nach der PCR wurden die entstandenen Produkte zusammen mit einem internen Längenstandard elektrophoretisch in einem automatischen DNA-Sequenziergerät getrennt. Anschließend erfolgte die exakte Bestimmung der Produkt-Fragmentlängen durch entsprechende Computerprogramme (Genescan™- und Genotyper™-Software, Applied Biosystems). Chromosom *BTA5*-Mikrosatelliten, die von den Arbeitsgruppen (AG) im ILRI (Nairobi) und im BNI (Hamburg) in der Trypanotoleranz-segregierenden F₂-Rinderpopulation genotypisiert wurden, sind in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2:

Mikrosatelliten auf *BTA5*, mit denen die Trypanotoleranz-segregierende F₂-Rinderpopulation (ILRI, Nairobi) genotypisiert wurde. Ihre Positionen wurden in centiMorgan (cM) oder als zytogenetische Position angegeben. AG-ILRI = Arbeitsgruppe ILRI/Nairobi, AG-BNI = Arbeitsgruppe BNI/Hamburg. Mikrosatelliten in Genen sind in *kursiver* Schrift dargestellt.

Mikrosatellit/Typ-I-Marker	Position in cM*	AG-ILRI	AG-BNI
ILSTS42	00.0	+	-
BP01	18.8	+	-
BL023	28.6	+	-
AGLA293	32.0	+	-
BM321	38.0	+	-
<i>Lysozym</i>	q23	+	-
<i>Interferon</i>	q22-24	+	-
BL037	50.0	+	-
BR2936	63.0	-	+
ETH010	68.6	+	-
BM1819	77.6	-	+
RM029	78.4	+	-
BM1248	88.4	-	+
ETH152	118.3	+	-
BM49	115.0	+	-
BM2830	113.5	+	-
ETH002	108.5	+	-
STS16	q21-23	-	+
BM315	100.1	-	+
BM6026	06.7	-	+

Zunächst wurden die Mikrosatelliten (Tabelle 2-2), für die die Rinderpopulation genotypisiert werden sollte, in der Gründer(F_0)-Generation (4 N'Dama- und 4 Boran-Rinder) mittels Fragmentlängenbestimmung oder Sequenzierung auf ihre Informativität geprüft.

Die PCRs wurden bei den den Mikrosatelliten entsprechenden PCR-Bedingungen mit der DNA aller Rinder der Population durchgeführt. Dabei war jeweils einer der beiden Primer eines Paares mit TET (Tetrachlorofluoreszein) oder FAM (Caroxyfluoreszein) fluoreszenzmarkiert. Die Größe der Mikrosatelliten war weitgehend ähnlich, sodass nur einige wenige Multiplex-PCR-Ansätze durchgeführt werden konnten.

Je nach Qualität des PCR-Produktes (stichprobenartige Beurteilung durch Überprüfung im Agarosegel) wurden je 1–2 μ l des PCR-Produktes mit 2 μ l Längenstandard/Ladepuffer versetzt. 1,5–2 μ l dieses Gemisches wurden auf ein hochauflösendes denaturierendes Acrylamidgel aufgetragen und 4 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die anschließende Analyse der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Genescan™ und Genotyper™ (Applied Biosystems). Die Daten wurden tabellarisch dokumentiert und für die folgende Kopplungsanalyse aufgearbeitet.

2.2.12 Kopplungsanalyse

Die für das Analyse-Programm GeneHunter erforderliche Aufteilung der großen Rinderfamilien in kleinere Subfamilien wurde durch ein zusätzlich geschriebenes Computer-Programm von Müller-Myhsok (unpubliziert) erreicht. Die sieben Familien, die die F_2 -Generation bilden, bestehen aus 14 Elterntieren der F_1 -Generation und deren insgesamt 183 Nachkommen. Mit Hilfe des Computerprogramms konnten insgesamt 2267 Geschwisterpaare innerhalb der sieben Familien gebildet werden. Geschwister unterschiedlicher Familien wurden dabei nicht vermischt.

Jedes Geschwisterpaar bekam seine Eltern (F_1 -Generation) und Großeltern (F_0 -Generation) zugeordnet. Die Genotypen der Mitglieder der Subfamilien waren in vorangegangenen Experimenten anhand von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen oder durch Fragmentlängenunterschieden für 23 Marker ermittelt worden. Für 16 Trypanotoleranz-Merkmale (siehe Kapitel 7.4) wurden die Genotypen in den Subfamilien mit Hilfe des Analyse-Programms GeneHunter auf Kopplung getestet.

Die hier vorliegende Analyse ist eine nicht-parametrische, d.h., es wurde keine bestimmte Verteilung wie z.B. die Normalverteilung der Parameter angenommen. Ermittelte QTL werden bei nicht-parametrischen Analysen grafisch gegen einen *Z-score* aufgetragen. Der

Z-score quadriert und durch den doppelten natürlichen Logarithmus ($2 \ln$) dividiert entspricht in etwa dem Lodscore ($Z\text{-score}^2 \div 2 \div \ln \sim \text{Lodscore}$), der bei parametrischen Analysen angegeben wird.

3 Ergebnisse

Für die physikalischen Genomkarten beim Rind stehen nur eine begrenzte Anzahl von Markern zur Verfügung, und deren Verteilung auf den Chromosomen ist nicht gleichmäßig. Ziel ist es, bisher unbekannte Marker und Gene auf Chromosom *BTA5* zu definieren, die es ermöglichen sollen, die ermittelte Trypanotoleranz-QTL-Region auf *BTA5* (Hanotte und Korol, unpubliziert) genauer als bisher zu kartieren und einzuengen.

3.1 Auswahl der Marker und Gene

Die Voraussetzung für die Auswahl aller Marker war, dass sie auf Chromosom *BTA5* liegen. Zur Feinkartierung des Chromosoms war es dabei zunächst von untergeordneter Bedeutung, ob es sich hierbei um anonyme Marker oder um Gene handelte.

3.1.1 Identifikation anonymer Marker

Sequenzmarkierende Stellen (*sequence tagged sites*), STS-Marker

Die Amplifikationsprodukte der chromosomensegmentspezifischen Bibliothek wurden in den Vektor pPCR-Script AMP SK(+) ligiert und anschließend in Epicurian Coli XL10-Gold ultrakompetente Zellen (Stratagene) transformiert. 625 Klone wurden isoliert. Eine Vorselektion durch einen Restriktionsverdau half, unspezifische Inserts aus Primer-Konkatemeren von spezifischen Inserts aus Amplifikationsprodukten zu trennen (siehe Kapitel 2.2.6.2). Von den 625 Klonen standen danach 175 für eine weitere Analyse zur Verfügung. Anschließendes Sequenzieren der Klone zeigte, dass deren Inserts häufig identisch waren. Von 25 Inserts wurden Primer abgeleitet. Zwei Primerpaare kreuzhybridisierten mit Hamster-DNA, und auch ein Neuentwurf der Primer ließ keine Differenzierung zwischen den Amplifikaten von Rind und Hamster zu. Eine Rinderspezifität der Primer war notwendig, da sie später für die PCR-Analyse von Hybridzelllinienkonstrukten (SCH-, RH-Panels), die aus Rinder-DNA und Hamsterzellen bestehen, eingesetzt werden sollten. Sieben Primerkombinationen ergaben mehrere Amplifikationsprodukte. Aus 625 Klonen wurden insgesamt 16 spezifische sequenzmarkierende Stellen (*sequence tagged sites*, STS) abgeleitet. Einer dieser STS-Marker ist ein Mikrosatellit, ein weiterer eine Gensequenz für das Gen CDK2.

Die Originalsequenzen der STS-Marker und ihre Primer sind im Anhang (siehe Kapitel 7.2) aufgeführt.

Tabelle 3-1: Sequenzmarkierende Stellen (*sequence tagged sites*, STS) mit Größenangabe, die in der chromosomensegmentspezifischen Bibliothek des Chromosoms *BTA5q21-24* identifiziert wurden. Der Mikrosatellit (STS16) und das Gen (*CDK2*) sind kursiv dargestellt.

Fragment- bezeichnung	Größe in bp
STS1	104
STS3	300
STS5	167
STS6	209
STS8	161
STS9	215
STS11	173
STS12	156
STS13	176
STS14	177
STS15	134
<i>STS16</i>	<i>196-203</i>
STS18	131
STS19	165
STS21	161
<i>CDK2</i>	<i>107</i>

3.1.2 Identifikation von Typ-I-Markern

Auswahl von Genen in der QTL-Region auf Chromosom *BTA5*

Eine Liste von 27 Genen wurde aufgestellt. Zunächst wurde Chromosom *BTA5* betrachtet. Elf dort bereits bekannte Gene wurden ausgewählt. Sechs von ihnen waren zytogenetisch kartiert, von den fünf weiteren Genen lag keine Information über deren Lage auf *BTA5* vor. Weiterhin wurden bekannte konservierte syntänische Gruppen zwischen Mensch, Maus und Rind betrachtet. Durch vergleichende Analysen dieser Gruppen wurden Gene aufgrund ihrer zu erwartenden Position auf *BTA5* ausgewählt. In Anbetracht der großen QTL-Region wurde die Auswahl der Gene nach dem Kriterium *Position* durch Hinzunahme des Kriteriums *Funktion* nach immunologischen, hämatopoetischen und/oder wachstumsbeeinflussenden Aspekten eingeschränkt. Die Funktion der Gene leitet sich aus der humanmedizinischen Forschung ab und ist überwiegend im Mausmodell bestätigt. Die Homologien zwischen den Säugern lassen in der Regel eine Übertragung der Funktion auf das Rind zu.

Von den ausgewählten Genen (siehe Tabelle 3-2) wurden Oligonukleotidprimer abgeleitet, und PCR-Bedingungen für diese etabliert. Nur bei den Genen, von denen Sequenzen oder Teilsequenzen beim Rind zumindest als cDNA bekannt und veröffentlicht waren, wurden

direkt rinderspezifische Primer abgeleitet. Bei den übrigen Genen wurden die Primersequenzen von Sequenzen von Mensch und/oder Maus abgeleitet. PCR-Reaktionen mit genomischer Rinder-DNA wurden durchgeführt, und die Amplifikate sequenziert. Die Amplifikate beinhalteten meistens neben kurzen Exonbereichen eine Intronsequenz. Anhand der Exonbereiche wurde überprüft, ob es sich bei den Sequenzen um die Abschnitte handelte, die zu der Ursprungssequenz vom Menschen oder der Maus homolog waren. Die Homologie neu identifizierter Rinder-Sequenzen zu bekannten Sequenzen anderer Spezies wurde mittels des BLAST-Algorithmus ermittelt.

Wenn die Primer mit anderer DNA als Rinder-DNA kreuzhybridisierten, wurde versucht, einen der Primer in den Intronbereich des Rindergens zu legen, da dadurch die Rinderspezifität des Primers gewährleistet wurde. Bei 15 Genen waren Exonprimer rinderspezifisch, bei sieben Genen wurde zu einem im Exon liegenden Primer ein Intronprimer zur Erhöhung der Spezifität benötigt. Zwei Gene wurden mit Intronprimern amplifiziert.

Die Sequenzen der amplifizierten Genfragmente inklusive der Primer sind im Anhang (siehe Kapitel 7.2) tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 3-2:

Liste aller ausgewählten Kandidatengene, die auf Chromosom *BTA5* aufgrund der vergleichenden Kartierung bei Mensch und Maus angenommen wurden. Neben den Gensymbolen sind, sofern bekannt, die Positionen bei Rind, Mensch und Maus aufgeführt.

Die Positionsangaben basieren bei Rind (*BTA*) und Mensch (*HSA*) auf zytogenetischen Befunden. Bei der Maus basieren sie auf Kopplungskarten und zytogenetischen Befunden. Die Ziffern vor dem Doppelpunkt geben das Chromosom an, auf dem sich das Gen befindet, die Ziffern dahinter die centiMorgan-Position. ?=bisher nicht kartiertes Gen; 5?=Gen wird auf *BTA5* aufgrund konservierter Syntanie vermutet.

Gensymbol	Genbezeichnung	Position		
		<i>BTA</i>	<i>HAS</i>	<i>MMU</i>
CCNT1	Zyklin T	5?	12q12	?
CD9	CD9 Antigen	5	12p13	6: 56.0
CDK2	Zyklin-abhängige Kinase 2	5	12q13	?
DCN	Decorin	5	12q21.3-23	10: 55.0
DMT1	Divalentes Eisentransportprotein 1	?	12q13	15: 59.8
GALGT	Beta-1,4-Azetylgalaktosaminyltransferase	5?	12q13.3	10: 69.3
GPD1	Glyzerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (NAD ⁺) 1	5?	12pter-12qter	10: 56.8
IFN-γ	Interferon γ	5q22-24	12q14	10: 67.0
IGF1	Somatomedin C	5	12q22-23	10: 48.0
ITGB7	Integrin beta 7	5?	12q13.1	15: 61.1
LALBA1	Lactalbumin alpha	5q21	12q13	?
LYZ@	Lysozym	5q23	12pter-12qter	10: 66.0
MGF1	Mastzell- (oder Stammzell-)faktor 1	5	12q22	10: 57.0
MIP	Hauptintrinsisches Protein	?	12q13	10: 74.0
NF-E2	Kernfaktor 2 erythroider Genese 2.45kD	5?	12q13.1-13.3	15: 61.7
NF-YB	Transkriptionsfaktor Y, B Untereinheit	?	12q22-24.1	10: 43.7
NTS	Neurotensin	5q13	12q21	?
POLE	DNA-Polymerase, ϵ Untereinheit	<i>BTA5</i> oder <i>BTA17</i>	12q24.3	5: 56.0
PPP1CC	katalytische Untereinheit der Protein-phosphatase 1, γ Isoform	<i>BTA5</i> oder <i>BTA17</i>	12q24.1	5 F-G1
PRIM	Primase 1	?	12q13	10: 77.0
PRKAG1	nichtkatalytische AMP aktivierte Proteinkinase γ 1	5q21-22	12q12-14	15: 53.0
PTPRB	Protein-Tyrosinphosphatase, Rezeptortyp beta	?	12q15-q21	5: 58.0
SOCS2	Hemmprotein 2 der Zytokinsignal-kette	?	12q21.3-23	10: 52.0
SYB1	Synaptobrevin 1	5?	12p	6: 56.0
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase	<i>BTA5</i> oder <i>BTA17</i>	12pter-12qter	5 F
VDR	Vitamin-D-Rezeptor	5?	12q12-14	5: 56.0
VWF	von-Willebrand-Factor	5q35	12p13.3-13.2	6: 60.8

3.1.2.1 Kartierung der Marker mit Hilfe somatischer Hybridzelllinien-DNA

Alle aufgeführten Gene wurden mit Hilfe von somatischen Hybridzelllinien (SCH-Panel) daraufhin überprüft, ob sie auf Chromosom *BTA5* liegen. Dies geschah mit Hilfe der rinderspezifischen Primer der Gene in PCR-Reaktionen. Die Resultate des PCR-Screenings wurden im Labor von Womack (Texas/USA) statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse der Analyse ist in Tabelle 3-3 wiedergegeben.

Tabelle 3-3: Ergebnisse der statistischen Analyse der mit Hilfe des SCH-Panels kartierten Gene und deren Zuweisung zu dem entsprechenden Chromosom beim Rind. Die Übereinstimmung der PCR-Screeningdaten mit den chromosomenspezifischen Referenzdaten des Labors in Texas/USA ist in Prozent angegeben. Bei einer Übereinstimmung der Screeningdaten eines Gens mit den Referenzdaten eines Rinderchromosoms von mindestens 85% gilt die Lage dieses Gens auf dem entsprechenden Chromosom als gesichert (Johnson, pers. Mitteilung).

Gensymbol	Genbezeichnung	Übereinstimmung der PCR-Screening- und Referenzdaten in %	Referenzchromosom <i>BTA</i>
CCNT1	Zyklin T	100	5
CD9	CD9 Antigen	93	5
CDK2	Zyklin-abhängige Kinase 2	100	5
DCN	Decorin	100	5
DMT1	Divalentes Eisentransportprotein 1	100	5
GALGT	Beta-1,4-Azetylgalaktosaminyltransferase	97	5
GPD1	Glyzerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (NAD ⁺) 1	100	5
IFN-γ	Interferon γ	100	5
IGF1	Somatomedin C	97	5
ITGB7	Integrin beta 7	93	5
LALBA	Lactalbumin alpha	97	5
LYZ@	Lysozym	97	5
MGF1	Mastzell- (oder Stammzell-)faktor 1	90	5
MIP	Hauptintrinsisches Protein	87	5
NF-E2	Kernfaktor 2 erythroider Genese 2.45kD	100	5
NF-YB	Transkriptionsfaktor Y, B Untereinheit	80	5 oder 24
NTS	Neurotensin	97	5
POLE	DNA-Polymerase, ϵ Untereinheit	61	17
PPP1CC	katalyt. Untereinheit der Proteinphosphatase 1, γ Isoform	93	17
PRIM	Primase	100	5
PRKAG	nichtkatalytische AMP aktivierte Proteinkinase γ 1	97	5
PTPRB	Protein-Tyrosinphosphatase, Rezeptortyp beta	94	5
SOCS2	Hemmprotein 2 der Zytokinsignalkette	94	5
SYB1	Synaptobrevin 1	100	5
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase	93	17
VDR	Vitamin-D-Rezeptor	100	5
VWF	von-Willebrand-Factor	97	5

Elf von 27 der in Tabelle 3-3 aufgeführten Gene lagen bekanntermaßen auf Chromosom *BTA5*. Sechs davon (IFN- γ , LALBA, LYZ@, NTS, PRKAG1 und VWF) waren zytogenetisch kartiert, von den fünf weiteren Genen (CD9, CDK2, DCN, IGF1 und MGF1) gab es keine Positionsangaben. Sechzehn Gene wurden aufgrund konservierter Syntanie bei Mensch und Maus auf Chromosom *BTA5* vermutet und mit Hilfe der SCH-Kartierung wurden zwölf von ihnen eindeutig Chromosom *BTA5* zugeordnet: CCNT1, DMT1, GALGT, GPD1, ITGB7, MIP, NF-E2, PRIM, PTPRB, SOCS2, SYB1 und VDR. Die PCR-Ergebnisse lassen für das Gen NF-YB keine eindeutige Bestätigung der Zugehörigkeit zu Chromosom *BTA5* zu. Die drei Gene POLE, PPP1CC und UNG wurden auf anderen Rinderchromosomen lokalisiert, wobei auch für POLE die Chromosomenzugehörigkeit mittels SCH-Panel nicht eindeutig geklärt wurde.

Mikrosatelliten wurden nicht mit Hilfe des somatischen Hybridzelllinien-Panel auf ihre Chromosomenzugehörigkeit überprüft, da sie von publizierten Kopplungskarten des Chromosoms *BTA5* übernommen wurden. Die neu definierten STS-Marker (siehe Tabelle 3-1) wurden von der segmentspezifischen Bibliothek des Chromosoms *BTA5* abgeleitet, deren mikrodissektierte DNA in einer FISH-Analyse auf ihre Zugehörigkeit zu dem Chromosom *BTA5* überprüft worden war (siehe Kapitel 1.1.4). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, die Fragmente mit der somatischen Zelllinien-DNA erneut auf ihre Chromosomenzugehörigkeit zu überprüfen.

3.2 Kartierung der Gene und Mikrosatelliten mittels BovRH5- und BovRH12-Panel-DNA

Das Hybridzelllinienkonstrukt BovRH5-Panel (siehe Kapitel 2.2.5 und 2.2.7) stand zur Verfügung, um die Anordnung von Markern auf dem Chromosom zu ermitteln. Die Analyse dieses Panels mit Hilfe von PCRs und einer anschließende statistische Auswertung der PCR-Ergebnisse führte zur Identifikation der Reihenfolge von den 24 Genen, die bereits mit Hilfe des SCH-Panels *BTA5* zugewiesen werden konnten. Zusätzlich wurde die Reihenfolge der 17 Mikrosatelliten, die publizierten Kopplungskarten von *BTA5* entnommen wurden, ermittelt.

3.2.1 Identifikation von Kopplungsgruppen der Marker

Das BovRH5-Panel besteht aus 90 Hybridzelllinien. Die DNA der einzelnen Klone wurde in PCRs unter Verwendung von rinderspezifischen Primern auf Anteile vom Chromosom *BTA5* hin untersucht.

Die Anzahl der positiven Signale lag je nach PCR-Ansatz für die Genfragmente und Mikrosatelliten zwischen sieben und 22. Der durchschnittliche Wert lag bei 14 positiven Signalen je Primerkombination mit einer Standardabweichung von 3,5.

Mit der 2-Punkt-Analyse (*two-point-analysis*, RH2pt) des RHMAP-Programmes wurde die Kopplung paarweise zwischen allen Loci getestet. Bei einem Lodscore von 4.0 zeigten alle 41 auf dem BovRH5-Panel untersuchten Loci Kopplung zueinander. Bei einem Lodscore von 6.0 zeigten 39 von 41 Loci Kopplung zu einer von zwei Kopplungsgruppen. Zwei Loci, *BM315* und *URB60*, zeigten keine Kopplung zu einer der beiden Gruppen. Bei dem Lodscore von 8.0 teilen sich die zwei bei Lodscore 6.0 erhaltenen Kopplungsgruppen in fünf Gruppen auf. Bei diesem Lodscore lassen sich vier Loci (*BM315*, *INRA104*, *URB60* und *CDK2*) keiner Gruppe zuordnen. Der Locus *INRA104* ließ sich bei Herabsetzen des Lodscores auf 7.0 gut in die Kopplungsgruppe 2 einfügen. Die fünf Kopplungsgruppen sind in Tabelle 3-4 dargestellt.

Tabelle 3-4: Kopplungsgruppen (KG) für 41 auf dem BovRH5-Panel untersuchten Loci bei einem Lodscore von 8.0, ermittelt durch die 2-Punkt-Analyse des RHMAP-Programms. 4 Marker lassen sich keiner Kopplungsgruppe zuordnen. *Kursiv* dargestellt sind Mikrosatelliten.

Kopplungsgruppe	KG 1	KG 2	KG 3	KG 4	KG 5
Loci	NF-YB	CCNT1	PRIM	<i>BR2936</i>	CD09
	<i>BL23</i>	GPD1	MIP	<i>BM0049</i>	SYB1
	<i>BL37</i>	DCN	<i>ETH2</i>	<i>BM2830</i>	VWF
	IFN- γ	<i>AGLA293</i>	<i>ETH10</i>		
	LYZ@	<i>BP01</i>	GALGT		
	<i>BM1819</i>	<i>BM6026</i>			
	IGF1	<i>ILSTS42</i>			
	PTPRB	ITGB7			
		DMT1			
		<i>ILSTS22</i>			
		MGF1(SCF1)			
		NF-E2			
		LALBA			
		VDR			
		SOCS2			
		PRKAG			
		NTS			
		<i>BMC1009</i>			
Loci, die keiner Kopplungsgruppe angehörig sind				KG Ø	
				<i>BM315</i>	
				<i>INRA104</i>	
				<i>URB60</i>	
				CDK2	

3.2.2 Anordnung der Loci

3.2.2.1 Retentionsmodell für die RH-Kartierung

Um die Anordnung der Loci auf dem Chromosom bestimmen zu können, muss zunächst die Retentionsfrequenz der Chromosomenbruchstücke in dem RH-Panel ermittelt werden.

Anhand der Retentionsfrequenz wird ersichtlich, ob alle Bereiche eines Chromosoms gleichmäßig durch Chromosomenbruchstücke im RH-Panel repräsentiert werden, oder ob bestimmte Chromosomenregionen überdurchschnittlich oft bzw. selten im Panel vertreten sind. Für das Chromosom *BTA5* wurde anhand der kartierten Loci mit dem BovRH5-Panel eine gleichmäßige Retentionsfrequenz (RF) gefunden. Die gleichmäßige Anzahl an positiven PCR-Signalen, die für die über das Chromosom verteilten kartierten Loci ermittelt wurden, zeigt, dass alle Chromosomenbereiche von *BTA5* gleichmäßig oft im Panel vorhanden sind.

Die maximale Anzahl an positiven PCR-Signalen, die für einen der 41 Loci beobachtet wurde, lag bei 22 positiven PCR-Signalen bei den untersuchten 90 Hybridzelllinien-DNA-Proben, während die niedrigste Anzahl sieben PCR-Signalen entsprach (Tabelle 3-5). Die RF für 22 positive PCR-Signale eines Loci beträgt 0,25 (25%), was bedeutet, dass in 25% der Hybridzelllinien des Panels das entsprechende Chromosomenbruchstück von *BTA5* vorliegt. Durchschnittlich wurden pro Loci 14 PCR-Signale beobachtet. In Tabelle 3-5 ist die RF und die entsprechende Anzahl an positiven PCR-Signalen pro Locus aufgelistet.

Für die Analyse wurde das RHMAP-Programm „*equal retention model*“ eingesetzt. Alternative Modelle sind z.B. das „*centromeric (telomeric)*“ oder das „*left-endpoint*“ Modell, bei denen unterschiedliche RF der Chromosomenbruchstücke in den Zentromerbereichen bzw. den Endbereichen vorausgesetzt wird.

Tabelle 3-5: Auflistung der an den 90 Hybrid-Zelllinien des BovRH5-Panel analysierten Loci und deren Retentionsfrequenz (RF) in absoluten Werten und in Prozent, sowie die Anzahl der positiven PCR-Signale pro Locus. Der jeweils höchste und niedrigste Wert wurde grau hinterlegt. Mikrosatelliten sind in *kursiver* Schrift angegeben.

Marker	RF	RF in %	positivePCR-Signale pro BovRH5-Panel
<i>AGLA293</i>	0.144	14%	13
<i>BL023</i>	0.144	14%	13
<i>BL037</i>	0.133	13%	12
<i>BM0049</i>	0.167	17%	15
<i>BM1819</i>	0.144	14%	13
<i>BM2830</i>	0.156	16%	14
<i>BM315</i>	0.078	8%	7
<i>BM6026</i>	0.189	19%	17
<i>BMC1009</i>	0.222	22%	20
<i>BP001</i>	0.189	19%	17
<i>BR2936</i>	0.111	11%	10
CCNT1	0.178	18%	16
CD09	0.111	11%	10
CDK2	0.101	10%	9
DCN	0.169	17%	15
DMT1	0.18	18%	16
<i>ETH002</i>	0.156	16%	14
<i>ETH10</i>	0.189	19%	17
GALGT	0.189	19%	17
GPD1	0.124	12%	11
IFN- γ	0.122	12%	11
IGF1	0.122	12%	11
<i>ILSTS022</i>	0.233	23%	21
<i>ILSTS42</i>	0.167	17%	15
<i>INRA104</i>	0.133	13%	12
ITGB7	0.191	19%	17
LALBA	0.184	18%	16
LYZ@	0.167	17%	15
MGF1	0.122	12%	11
MIP	0.2	20%	18
NF-E2	0.178	18%	16
NF-YB	0.144	14%	13
NTS	0.136	14%	12
PRIM	0.133	13%	12
PRKAG	0.178	18%	16
PTPRB	0.133	13%	12
STATi2	0.135	14%	12
SYB1	0.133	13%	12
<i>URB60</i>	0.25	25%	22
VDR	0.157	16%	14
VWF	0.122	12%	11

3.2.2.2 Bestimmung der Locus-Anordnung im BovRH5-Panel

Um ein Gerüst aus Loci zu erstellen, deren Anordnung zueinander mit einer Wahrscheinlichkeit von 1000:1 die beste Reihenfolge darstellt (Lange et al., 1995), wurde die Maximum-likelihood-multipoint-Analyse auf alle Loci angewendet. Durch das Errechnen des Programms, mit welcher Wahrscheinlichkeit Kopplung zwischen zwei Loci vorliegt, wurde die Reihenfolge der einzelnen Loci ermittelt.

Die Kopplungsgruppen (KG) 1 und 2 wurden mittels der multipoint-Analyse miteinander verbunden, und die Reihenfolge der Loci innerhalb der Gruppen wurde definiert. Die Kopplungsgruppe 3 wird von den Loci *CDK2* und *BM315*, die keiner Kopplungsgruppe angehörten, flankiert. *CDK2* bildet eine Verbindung zwischen den Kopplungsgruppen 2 und 3. Die Loci der Kopplungsgruppe 4 wurden telomer von *BM315* angeordnet. Die Kopplungsgruppe 5 schließt sich an die Kopplungsgruppe 4 an. Der Marker *URB60*, der keiner Kopplungsgruppe zugehörig war, wurde an die Kopplungsgruppe 5 angegliedert. Generell waren die Abstände innerhalb der Kopplungsgruppen im Vergleich zu den Abständen zwischen den verschiedenen Kopplungsgruppen gering, wobei jedoch der Abstand zwischen der Kopplungsgruppe 4 und 5 eine Ausnahme bildet. Dies gilt auch für den Abstand der Loci, die einzeln an die Kopplungsgruppen angefügt wurden, da sie keiner Kopplungsgruppe angehörten (Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6:

Mit RHMAP ermittelte Reihenfolge für die auf dem BovRH5-Panel kartierten Loci vom Zentromer zum Telomer des Chromosoms *BTA5*. Der Abstand in centiRad (Einheit des RH-Panels, cR) beschreibt den statistisch ermittelten Abstand zwischen einem Locus einer Zeile zu dem in der nächsten Zeile folgenden Locus. KG=Kopplungsgruppe. Ø=keiner Kopplungsgruppe angehörig. Mikrosatelliten sind in *kursiver* Schrift dargestellt.

KG	Locus	Distanz (cR)
KG2	<i>ILSTS42</i>	3.95
KG2	<i>BM6026</i>	10.8
KG2	<i>BPI</i>	12.1
KG2	NTS	6.43
KG2	DCN	7.63
KG2	MGF1	6.95
KG2	<i>INRA104</i>	13.15
KG2	<i>AGLA293</i>	3.63
KG2	STAT2	4.48
KG2	NF-E2	6.48
KG2	<i>ILSTS22</i>	2.35
KG2	<i>BMC1009</i>	6.83
KG2	DMT1	1.9
KG2	ITGB7	5.95
KG2	GPD1	10.83
KG2	PRKAG	3
KG2	LALBA	0
KG2	CCNT1	3.95
KG2	VDR	18.9
KG1	PTPRB	8.25
KG1	<i>BL37</i>	1.15
KG1	<i>BL23</i>	21.13
KG1	<i>LYZ@</i>	4.78
KG1	IFN- γ	5.65
KG1	IGF1	6.4
KG1	NF-YB	7.6
KG1	<i>ETH10</i>	10.8
Ø	CDK2	22.08
KG3	<i>BM1819</i>	2.68
KG3	MIP	6.6
KG3	PRIM	8.18
KG3	GALGT	7.65
KG3	<i>ETH2</i>	22.03
Ø	<i>BM315</i>	12.98
KG4	SYB	2.65
KG4	CD9	1.35
KG4	VWF	7.65
KG5	<i>BR2936</i>	5.18
KG5	<i>BM2830</i>	3.15
KG5	<i>MAF48</i>	13
Ø	<i>URB60</i>	

Je enger zwei Loci auf dem Chromosom zusammenliegen, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Bruchpunkt des Chromosoms durch die Gamma-Strahlung bei der Erstellung des BovRH5-Panels zwischen ihnen liegt. Die relativen Abstände der Loci zueinander (0 bis 22.08cR, Tabelle 3-6) errechnet das Programm anhand der positiven und negativen PCR-Signale der einzelnen Loci und dem Retentionsmodell, das für die Analyse zugrundegelegt wurde. Der Abstand z.B. zwischen den beiden Loci *ILSTS42* und *BM6026* beträgt im BovRH5-Panel 3.95cR, was einer Frequenz an Chromosomenbrüchen zwischen den beiden Loci von 3.95% entspricht. Dies bedeutet, dass die beiden Loci mit einer Wahrscheinlichkeit von 96.05% auf einem Chromosomenbruchstück liegen. In Abbildung 3-1 wird die Anordnung aller lokalisierten Gene und Mikrosatelliten als Karte dargestellt.

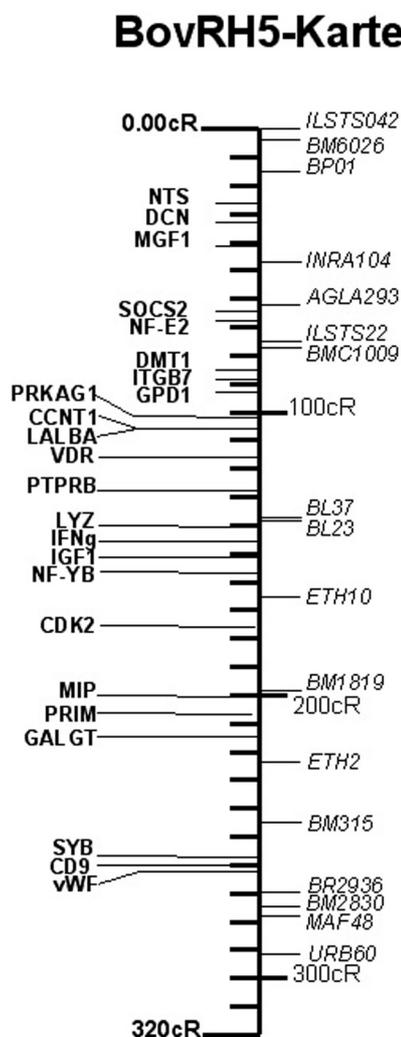


Abbildung 3-1:

Darstellung der Positionen der Gene und Mikrosatelliten in einer Radiationhybrid-Karte auf *BTA5*, die mit Hilfe des BovRH5-Panels kartiert wurden (BovRH5-Karte).

Die Skalierung erfolgte bei der RH-Karte in centiRad (cR). Mikrosatelliten sind in kursiver Schrift dargestellt.

In Abbildung 3-2 wird die Distanz und die Reihenfolge von 15 Loci, die sowohl in dieser Arbeit als auch in einer anderen BovRH5-Karte, die zuvor von Band et al. (2000) erstellt wurde, dargestellt. Die RH-Karten werden mit einer Kopplungskarte (MARC-MAP) verglichen. Dabei fallen die Marker IGF1, *BR2936* und *BL23* und *ETH2* durch unterschiedliche Positionierungen auf.

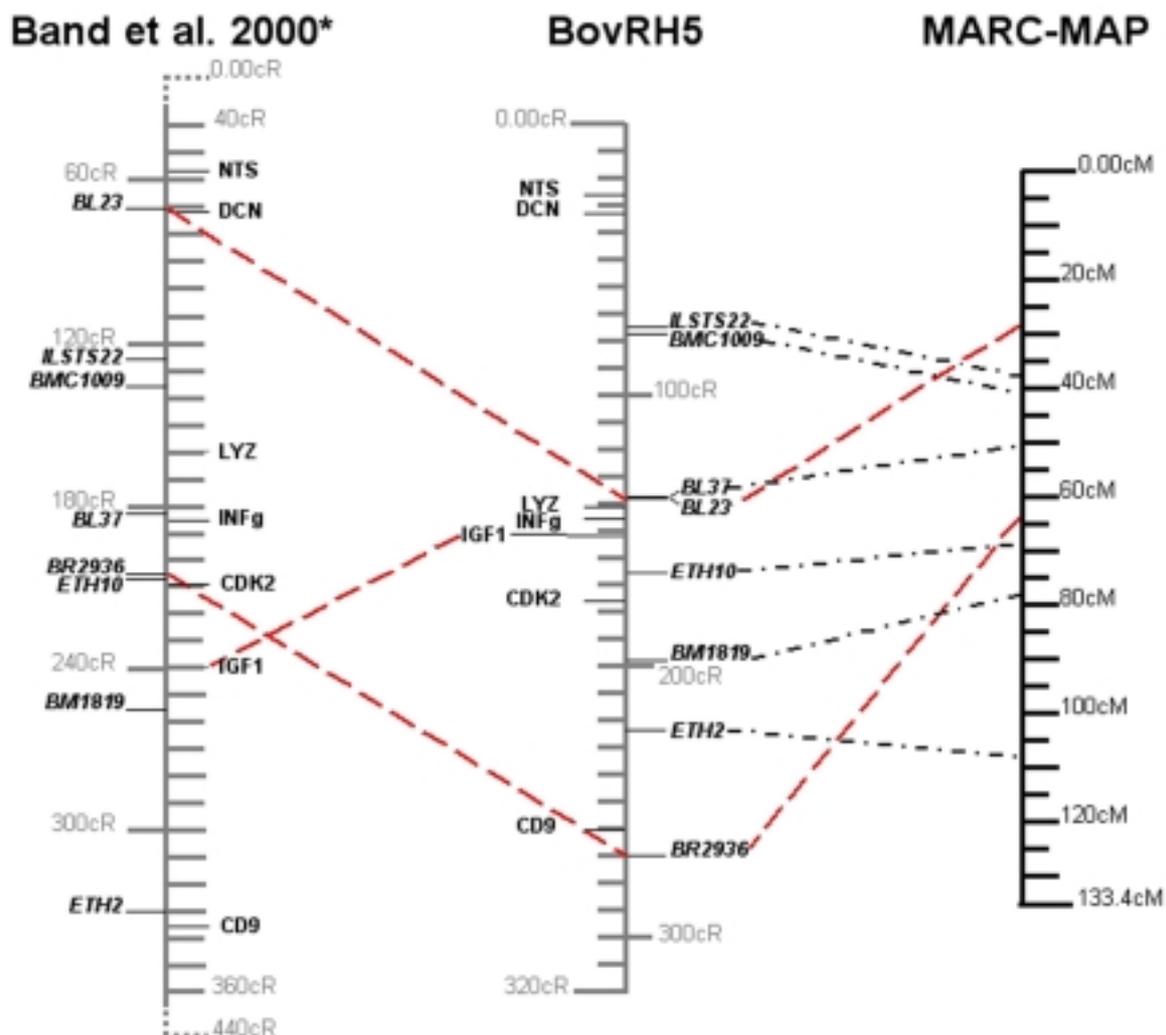


Abbildung 3-2:

Vergleichende Darstellung der Positionen von 7 Genen und 8 Mikrosatelliten (*kursiv* hervorgehoben) in der Radiationhybrid-Karte von Band et al. (2000)* und der in dieser Arbeit erstellten RH-Karte. Eine Mikrosatelliten-Kopplungskarte zeigt die Positionen der Mikrosatelliten an (MARC, http://marc.usda.gov/cgi-bin/species_chromosome?cattle+05). Die Skalierung erfolgte bei den beiden RH-Karten in centiRad (cR) und in der MARC-Map in centiMorgan (cM), wobei 1cM etwa 3cR entspricht. Schwarz gestrichelte Linien zeigen die Positionen der kartierten Mikrosatelliten in der MARC-Map an. Unterschiede in den Positionen sind durch rot gestrichelte Linien gekennzeichnet.

* Die hier dargestellte Form der Kopplungskarte von Band et al. (2000) entspricht nicht vollständig dem Original. Sie zeigt nur die Loci, die auch in dieser Arbeit kartiert wurden.

3.2.2.3 Bestimmung der Locus-Anordnung im BovRH12-Panel

Bei einem Vergleich der QTL-Regionen auf *BTA5* (siehe Kapitel 1.1.4) und der in dieser Arbeit erstellten BovRH5-Karte wurde ersichtlich, dass Marker, die oberhalb des Gens LALBA (5q21) bzw. des Mikrosatelliten *BMC1009* in Richtung Zentromer liegen, ausserhalb der QTL-Regionen liegen. Alle Marker, die also im BovRH5-Panel in dem Bereich von *ILSTS42* bis *BMC1009* lokalisiert wurden, wurden nicht mit Hilfe des BovRH12-Panels analysiert.

Neben den verbleibenden 16 Genen wurden mit Hilfe des Bov RH12-Panel nun auch die STS-Marker der segmentspezifischen Bibliothek von *BTA5* und zusätzliche Mikrosatelliten kartiert. Dies sollte die Anzahl der Marker in der Region *BTA5q21* - Telomer erhöhen.

Bei der Ermittlung der Anordnung der Loci über das BovRH12-Panel wurde genauso verfahren wie bei der Ermittlung der Locus-Reihenfolge über das BovRH5-Panel (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2).

Bis auf zwei Loci (STS11 und STS18) zeigten alle Loci bei der PCR-Analyse des BovRH12-Panels eine gleichmäßige Anzahl an positiven PCR-Signalen, sodass für den weiteren Verlauf der statistischen Auswertung das Modell „*equal retention model*“ für die 2-Punkt-Analyse des RHMAP-Programms zugrunde gelegt wurde.

Alle Gene, alle Mikrosatelliten und 13 STS-Marker lagen bei einem Lodscore von 6.0 in einer Kopplungsgruppe vor. Die Maximum-likelihood-multipoint-Analyse (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) wurde auf alle Loci der Kopplungsgruppe angewandt. Es wurde ein Gerüst aus Loci erstellt, deren Anordnung zueinander mit einer Wahrscheinlichkeit von 1000:1 die beste Reihenfolge darstellte. Die beiden STS-Marker STS11 und STS18 ließen sich nicht in die Karte integrieren. Tabelle 3-7 stellt die Anordnung der Loci vom Zentromer zum Telomer dar.

Tabelle 3-7: Mit RHMAP ermittelte Reihenfolge für die auf dem BovRH12-Panel kartierten Loci vom Zentromer zum Telomer. Der Abstand in centiRad (Einheit des RH-Panels, cR) beschreibt den statistisch ermittelten Abstand zwischen einem Locus einer Zeile zu dem in der nächsten Zeile folgenden Locus. KG = Kopplungsgruppe. Ø = keiner Kopplungsgruppe angehörig. Mikrosatelliten sind in *kursiver* Schrift dargestellt.

KG	Locus	Distanz (cR)
KG1	BMC1009	5.33
KG1	PRKAG	2.49
KG1	LALBA	3.12
KG1	CCNT1	7.66
KG1	VDR	6.4
KG1	BL37	2.28
KG1	BL4	1.5
KG1	PTPRB	8.7
KG1	STS21	4.62
KG1	STS19	1.95
KG1	CA500	9.67
KG1	LYZ@	6.04
KG1	IFN- γ	8.58
Ø	STS9	13.29
KG2	IGF1	2.57
KG2	STS12	5.74
Ø	NF-YB	11.4
KG4	STS8	11.18
KG4	MAF23	4.71
KG4	BR2936	5.08
KG4	STS1	7.69
KG4	BMS490	7.58
KG4	STS16	2.36
KG4	AGLA254	6.08
KG4	STS14	7.7
KG3	STS6	2.43
KG3	ILSTS66	3.75
KG3	STS5	12.54
KG9	STS15	3.13
KG9	GALGT	3.33
KG9	ETH10	3.54
KG9	MIP	2.48
KG9	PRIM	10.19
Ø	BMS1248	16.75
Ø	CDK2	10.48
Ø	BM315	10.88
KG6	STS13	3.04
KG6	STS3	13.67
KG8	SYB	2.1
KG8	CD9	2.18
KG8	VWF	2.73
KG8	BM772	8.01
Ø	ETH2	11.97
KG5	BM733	5.06
KG5	BM2830	9.39
KG7	ETH152	4.1
KG7	URB60	

In Abbildung 3-3 wird die Anordnung der mit Hilfe des BovRH12-Panels lokalisierten Gene, Mikrosatelliten und STS-Marker als Karte dargestellt.

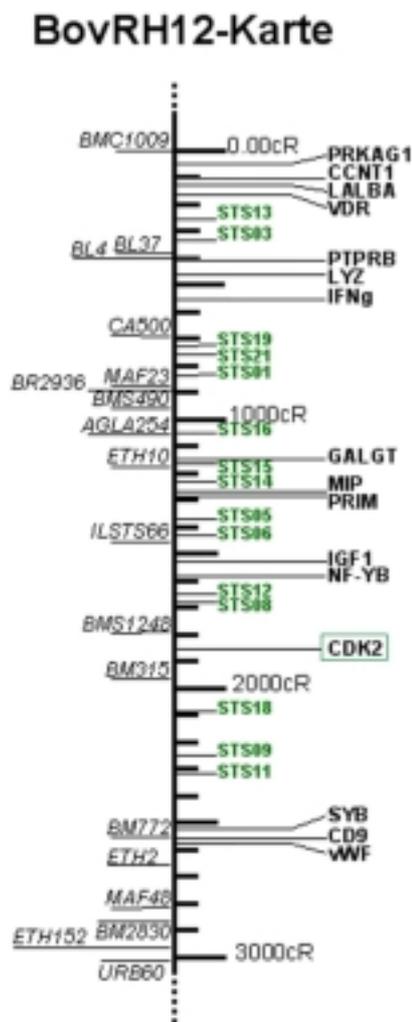


Abbildung 3-3:

Darstellung der Positionen der Gene, Mikrosatelliten und STS-Marker in einer Radiation-hybrid-Karte auf *BTA5*, die in dieser Arbeit mit Hilfe des BovRH12-Panels erstellt wurde (BovRH12-Karte).

Die Skalierung erfolgte bei der RH-Karte in centiRad (cR). Mikrosatelliten sind in *kursiver* Schrift, STS-Marker aus der segmentspezifischen DNA-Bibliothek *BTA5q21-24* sind in grüner Schrift dargestellt, das Gen *CDK2*, ebenfalls aus der Bibliothek, ist grün umrandet.

In Abbildung 3-4 wird die Distanz und die Locus-Reihenfolge der Gene und Mikrosatelliten in RH-Karten verglichen, die sowohl mit Hilfe des BovRH5- als auch BovRH12-Panels kartiert wurden. In der BovRH12-Karte sind die zusätzlich kartierten STS-Marker eingefügt. Ein centiRad in der BovRH5-Karte entspricht dabei etwa 14cR in der BovRH12-Karte.

Die Gene *CDK2* und *GALGT* sowie die Mikrosatelliten *BR2936*, *ETH2*, *BM315*, *MAF48* und *BM2830* nehmen unterschiedliche Positionen in den beiden Karten ein. In der BovRH12-Karte wurden elf STS-Marker zwischen den Mikrosatelliten *BL37* (5q22) und *ETH10* (5q25) kartiert.

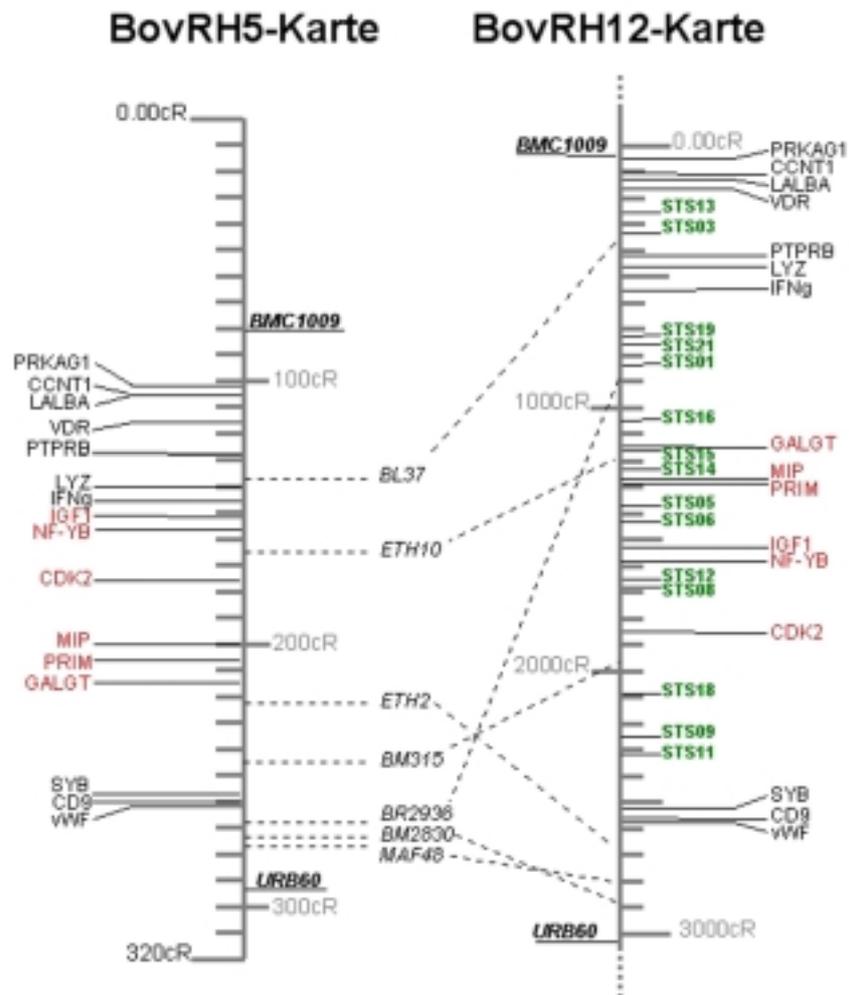


Abbildung 3-4:

Vergleich der Radiationhybrid-Karten, die mit Hilfe des BovRH5- und BovRH12-Panels erstellt wurden. Die Karten und deren Skalierung ist in grau dargestellt.

Gene, deren Anordnung sich in den beiden Karten nicht unterscheiden, sind in schwarzer Schrift, Gene mit unterschiedlichen Positionen in roter Schrift dargestellt. In grüner Schrift sind STS-Marker aus der chromosomensegment-spezifischen DNA-Bibliothek *BTA5q21-24* dargestellt. Mikrosatelliten sind in *kursiver* Schrift dargestellt, wobei fett dargestellte Mikrosatelliten im Randbereich des von Hanotte und Korol kartierten QTL-Bereichs für Typanotoleranz liegen.

Gene mit unterschiedlichen Positionen in der BovRH12-Karte im Vergleich zu der BovRH5-Karte sind in roter Schrift dargestellt. *BMC1009* und *URB60* sind Mikrosatelliten, die die QTL-Regionen auf *BTA5* flankieren. Die Mikrosatelliten *BL23* und *BM1819* sind aus labortechnischen Gründen im BovRH12-Panel nicht kartiert worden, sie wurden durch die Mikrosatelliten *BL4* und *BMS1248* ersetzt. Insgesamt wurden 18 Mikrosatelliten, 13 STS-Marker und 19 Gene mit Hilfe des BovRH12-Panels kartiert.

3.3 Vergleichende Kartierung

Nachdem die umfassende Karte des Chromosoms *BTA5* erstellt war, wurden die Positionen der kartierten Gene mit den Positionen homologer Gene bei Mensch und Maus verglichen. Dabei bestätigten sich die bekannten konservierten syntänischen Gengruppen von Chromosom *BTA5* und *HSA12*, sowie *BTA5* und *MMU6*, *MMU10* und *MMU15* (siehe Abb. 1-3, Seite 19). Darüber hinaus wurde eine weitere konservierte syntänische Gruppe ausgemacht. Diese Gruppe wird aus den Genen *VDR* und *PTPRB* gebildet. Beide Gene sind eng beieinander auf Chromosom *MMU5* der Maus zu finden.

Die Gene, die die syntänischen Gruppen von Mensch und Maus zu Chromosom *BTA5* vom Rind bilden, sind in Tabelle 3-8 dargestellt.

Tabelle 3-8: Die kartierten Gene mit Angabe der in dieser Arbeit ermittelten Reihenfolge sowie deren bekannten zytogenetischen Positionen auf *BTA5* und *HSA12*. Für *MMU* ist das Chromosom und dahinter die cM-Position des Gens angegeben. Bisher nicht eindeutig bekannte Positionen sind mit ? markiert. Ist nur die Chromosomenzugehörigkeit bekannt, wird diese mit der Ziffer für die Bezeichnung des Chromosoms angegeben.

* in dieser Arbeit ermittelte Gen-Position mit Hilfe der FISH-Kartierung.

Gen	Rind	Mensch	Maus
NTS	5q13	12q21	?
DCN	5	12q13.2	10:55.0
MGF1	5	12q22	10:57.0
SOCS2	5	12q21.3-23	?
NF-E2	5	12q13.1-13.3	15:61.7
DMT1	5	12q13	15:59.8
ITGB7	5	12q13.13	15:61.1
GPD1	5	12q12-13	15:56.8
PRKAG	5q11-14*	12q13.1	15:53.0
LALBA	5q21	12q13	?
CCNT1	5q11-14*	12	?
VDR	5q11-14*	12q12-14	5:56.0
PTPRB	5q11-14*	12q15-21	5:58.0
LYZ@	5q23	12	10:66.0
IFN-γ	5q22-24	12q24.1	10:67.0
IGF1	5	12q22-24	10:48.0
NF-YB	5	12q22-24.1	10:43.7
CDK2	5	12q13	?
MIP	5	12q13	10:74.0
PRIM	5	12q13	10:77.0
GALGT	5	12q13.3	10:69.25
SYB	5	12p	6:57.0
CD9	5	12p13	6:56.0
VWF	5q35	12p13.3-13.2	6:59.0

3.4 Zytogenetische Kartierung der Gene PTPRB, VDR, PRKAG1 und CCNT1

Die zytogenetische Kartierung der Gene PRKAG1, VDR, PTPRB und CCNT1 wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) in Kooperation mit Brunner am Institut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere in Dummerstorf durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.9). VDR, PTPRB und PRKAG1 hybridisierten ausschliesslich auf *BTA5*. CCNT1 zeigte deutliche Signale auf *BTA5*, jedoch zusätzliche leichte Signale auf anderen Chromosomen.

Abbildung 3-5:

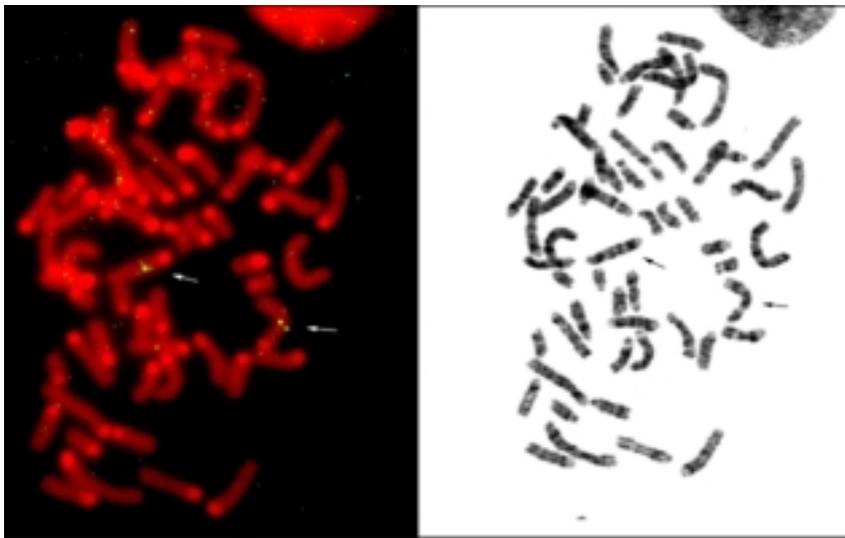


Abb. 3-5-1 PTPRB

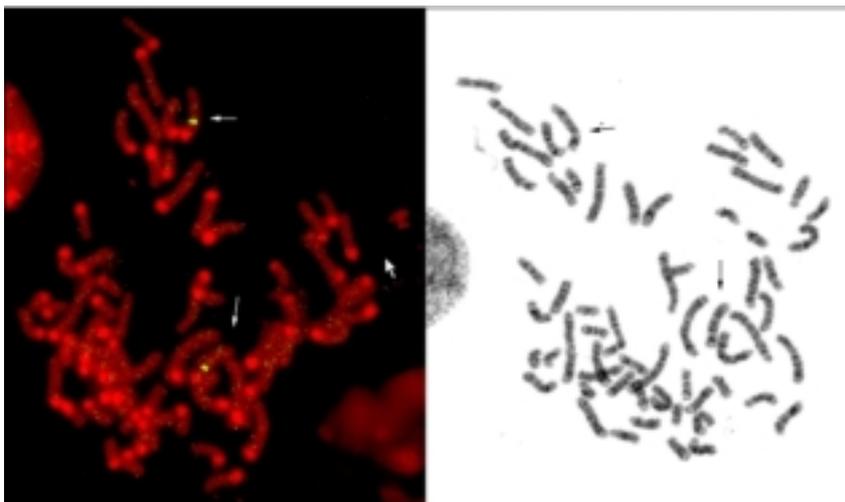
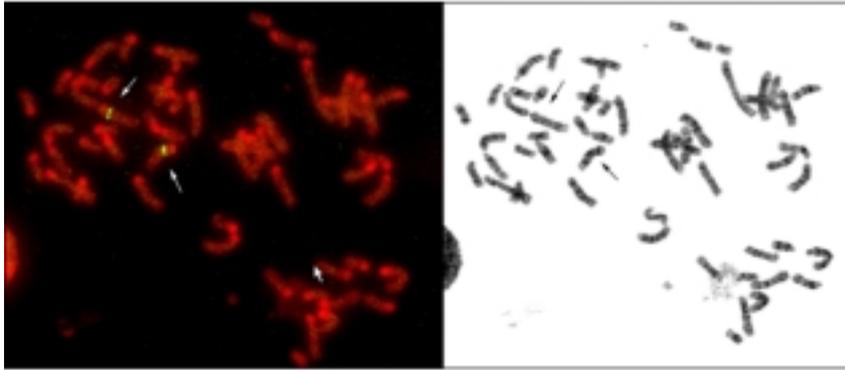
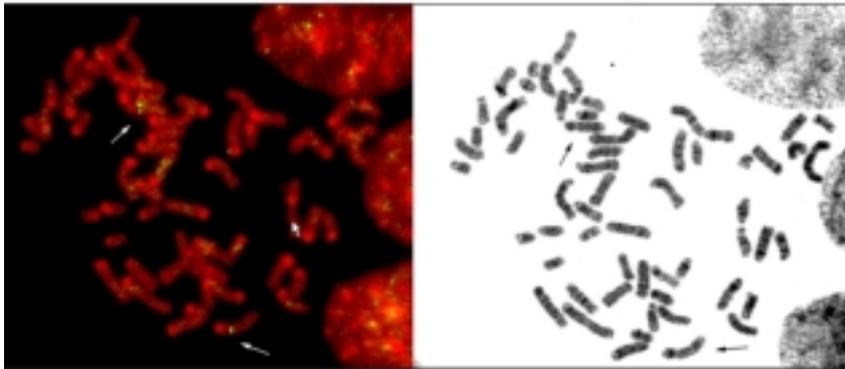


Abb. 3-5-2 VDR

**Abb. 3-5-3 PRKAG1****Abb. 3-5-4 CCNT1**

Die Abbildungen 3-5-1 bis 3-5-4 zeigen FISH-Analysen mit genspezifischen Sonden für PTPRB (Abb.3-5-1), VDR (Abb. 3-5-2), PRKAG1 (Abb. 3-5-3) und CCNT1 (Abb.3-5-4). Die Pfeile markieren Chromosom *BTA5*. Die Bilder auf der linken Seite zeigen die Metaphasechromosomen vom Rind nach Hybridisieren (gelb) mit der spezifischen fluoreszenzmarkierten Sonde. Die Bilder auf der rechten Seite zeigen dieselben Metaphasechromosomen mit Darstellung ihrer q-Bänderung.

3.5 Polymorphismen

Alle Gene und STS-Marker, die auf Chromosom *BTA5* lokalisiert wurden, wurden auf Sequenzpolymorphismen zwischen N'Dama- und Boran-Rinder hin untersucht. Neben der Kartierung der Marker auf *BTA5* zur Erhöhung der Markerdichte können sie, wenn sie polymorph zwischen den beiden Rassen sind, für die QTL-Neukartierung eingesetzt werden.

3.5.1 Identifizierung von Polymorphismen

Für die Identifizierung von Polymorphismen wurde die DNA der acht Großelterntiere (4 N'Dama- und 4 Boran-Rinder der F_0 -Generation) der Rinderpopulation, in der die Merkmale der Trypanotoleranz segregieren, mit Hilfe von PCR und anschließender Sequenzierung

der PCR-Produkte analysiert. Die jeweiligen Sequenzen der acht Tiere wurden im DNA-Sequenzieranalyse-Programms (Applied Biosystems) gegenübergestellt und verglichen.

3.5.1.1 Genfragmente

Dreiundzwanzig Genfragmente wurden sequenziert. Das Gen LYZ wurde nicht sequenziert, da die Primerkombination für einen im Intron liegenden Mikrosatelliten erstellt wurde. Dieser Mikrosatellit war von der Arbeitsgruppe in Nairobi in der F₀-Generation auf seine Informativität hin untersucht worden, und in der ersten QTL-Analyse eingesetzt worden.

Die Größe der Genfragmente lag zwischen 1003bp (CD9) und 107bp (CDK2). Insgesamt wurden 16 SNPs (*single nucleotide polymorphism*) bei den acht Tieren der F₀-Generation gefunden. Bei einer gesamten Sequenzlänge der Genfragmente von 7984bp entspricht dies einem Nukleotidaustausch auf etwa 500bp, unabhängig davon, ob mit dem Austausch eine Exon- oder Intronsequenz betroffen war.

Bei vier Genen wurde jeweils ein Nukleotidaustausch in einem Exon gefunden, wo er in zwei Fällen einen Aminosäureaustausch (AS-Austausch) in der Proteinsequenz bewirkte.

Die Polymorphismen in den Gen-Sequenzen der F₀-Generation, ihre Position im amplifizierten Fragment sowie die Lage in Exons oder Introns sind in Tabelle 3-9 aufgeführt.

Tabelle 3-9: SNPs und deren Position* in den Genfragmenten der F₀-Generation. In Klammern hinter den Genabkürzungen wird die Fragmentlänge in Basenpaaren (bp) angegeben. ND=N'Dama, B=Boran. Die in einer Doppelspalte zusammengefassten ND und B bilden ein Paar in der F₀-Generation. AS-Wechsel=Nukleotidaustausch bewirkt bei der Translation eine Änderung in der Aminosäuresequenz.

S=Serin, N=Asparagin, F=Phenylalanin. a=Adenin, c=Cytosin, g=Guanin, t=Thymin.

Genfragment	SNP-Position	AS-Wechsel	ND-07	B-1417	ND-08	B-1688	ND-09	B-1801	ND-10	B-2094
CD9 (1003bp)	Exon 1, +434		g/g	g/a	g/g	g/g	g/g	a/a	g/g	g/g
	Exon 1, +442		c/c	c/t	c/c	c/c	c/c	t/t	c/c	c/c
	Exon 1, +443		a/a	a/g	a/a	a/a	a/a	g/g	a/a	a/a
	Exon 1, +497		a/a	c/c	a/a	a/a	a/a	c/c	a/a	a/a
DMT1 (360bp)	Fo-Primer, +225		g/g	c/c	g/g	c/c	g/g	c/c	g/g	c/c
IGF1 (265bp)	Exon 1, 222		c/t	c/c	c/t	c/c	c/t	c/c	c/t	c/c
INTB7 (509bp)	# Exon 12, 115	S→N	g/g	a/a	g/g	a/a	g/g	a/a	g/g	g/g
LALBA (487bp)	Exon 1, +78		t/t	c/t	c/c	c/t	t/t	t/t	c/c	t/t
	Exon 1, +146		c/c	c/c	c/c	c/c	c/c	c/c	c/c	t/t
	Exon 1, +273		t/t	t/t	t/t	t/t	t/t	c/t	t/t	t/t
	Exon 1, +366		a/a	g/g	a/a	g/a	a/a	g/a	a/a	g/g
MGF1 (903bp)	Exon 4, +238		a/a	a/a	a/c	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a
MIP (241bp)	Fo-Primer, +33		c/c	c/t	c/c	c/c	t/t	c/t	c/t	t/t
SOCS 2 (351bp)	Fo-Primer, +116	S→F	c/c	c/c	c/c	c/t	c/c	c/c	c/c	c/c
SYB (598bp)	#Exon 3, +392		c/c	c/c	c/c	a/a	c/c	c/c	c/c	c/c
VDR (246bp)	#Exon 4, +4		t/t	c/t	t/t	c/t	t/t	c/t	t/t	c/t

Die Positionen der SNPs richtet sich nach der letzten Base des vorangegangenen Exons plus die Anzahl der Basen bis einschließlich dem SNP. Die Exon-Nummern wurden, wenn beim Rind nicht bekannt, vom Menschen übernommen (gekennzeichnet mit #). Bei SNPs in Exons gibt die Ziffer die Basenposition an. Ist keine Exon-Nummer bekannt, wird ab Ende des Forward (Fo)-Primers des Genfragments gezählt.

Der SNP-Nachweis in den Tieren der F₁- und F₂-Generation wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.10). In Tabelle 3-10 sind die Fragmentgrößen der Gene nach Restriktionsverdau aufgeführt.

Tabelle 3-10: Allelgrößen der Genfragmente ITGB7, DMT1, LALBA, VDR und CD9 nach Verdau mit Restriktionsenzymen

Typ-I-Marker	Restriktionsenzym	PCR-Produktlänge	Allel 1	Allel 2
ITGB7	<i>Pst</i> I	509bp	509bp	410+99bp
DMT1	<i>Sty</i> I	304bp	304bp	278+26bp
	<i>Fnu</i> 4HI	154bp	154bp	126+28bp
LALBA	<i>Nco</i> I	429bp	429bp	401+28bp
VDR	<i>Rsa</i> I	246bp	246bp	194+53bp
CD9	<i>Bsr</i> I	468bp	468bp	225+190+53bp

3.5.1.2 STS-Marker

Fünfzehn von insgesamt 16 STS-Marker wurden sequenziert. Der STS-Marker, der ein Mikrosatellit (STS16) war, wurde auf seine Informativität hin in der F₀-Generation mittels Fragmentlängenanalyse überprüft. Das Genfragment CDK2, das mit den STS-Markern zusammen aus der segmentspezifischen Bibliothek isoliert wurde (Tabelle 3-1), wurde unter Kapitel 3.1.2 bereits mit aufgeführt.

Zwölf unterschiedliche SNPs wurden in den STS-Markern bei den Tieren der F₀-Generation gefunden. Bei einer absoluten Sequenzlänge von 2565bp entspricht dies einem Nukleotid-austausch auf etwa 215bp.

Die Polymorphismen in den STS-Marker der F₀-Generation sowie deren Position im amplifizierten Fragment sind in Tabelle 3-11 aufgeführt. Die STS-Marker STS 3, STS 9, STS 13, STS 18, STS 19 und STS 23 zeigten keinen SNPs in der F₀-Generation.

Tabelle 3-11: SNPs und deren Position in den Typ-II-Markern in der F₀-Generation. In Klammern hinter den Typ-II-Sequenzen wird die Fragmentlänge in Basenpaaren (bp) angegeben. ND=N'Dama, B=Boran. Die in einer Doppelspalte zusammengefassten ND und B bilden ein Paar in der F₀-Generation. a=Adenin, c=Cytosin, g=Guanin, t=Thymin.

Typ-II-Sequenzen	SNP-Position	ND-07	B-1417	ND-08	B-1688	ND-09	B-1801	ND-10	B-2094
STS 1 (104bp)	Fo + 8	g/g	g/g	g/t	g/g	g/g	g/g	a/t	g/g
	Fo + 14	c/t	c/c	c/t	c/c	c/c	c/c	g/g	c/c
	Fo + 37	a/a	a/a	a/a	g/g	a/g	g/g	a/a	a/g
STS 5 (167bp)	Fo + 14	c/t	c/c	c/c	c/c	c/t	t/t	c/c	t/t
STS 6 (209bp)	Fo + 77	c/t	c/t	c/c	c/c	c/c	c/c	c/t	c/t
	Fo + 107	g/a	g/a	g/g	g/a	g/a	g/a	a/a	a/a
STS 8 (163bp)	Fo + 46	g/a	g/g	g/g	g/g	g/a	g/a	g/a	g/a
	Fo + 65	a/a	a/a	a/t	a/a	a/a	a/a	a/t	a/a
STS 11 (173bp)	Fo + 19	c/c	c/c	c/c	c/c	c/c	c/a	c/c	c/a
	Fo + 86	t/t	c/t	t/t	t/t	t/t	t/t	t/t	t/t
STS 12 (156bp)	Fo + 44	c/a	c/a	a/a	c/c	a/a	c/c	c/a	c/c
STS 14 (177bp)	Fo + 69	g/g	g/g	g/g	a/g	g/g	a/g	a/g	g/g
STS 15 (134bp)	Fo + 72	g/g	g/g	g/g	a/g	g/g	a/g	a/g	g/g

Die SNP-Positionen ergeben sich durch Numerierung der Basen ab Ende des Vorwärts-Primers (Fo) einschließlich des SNP.

3.6 Anwendung polymorpher Sequenzen

3.6.1 Beurteilung der Informativität der SNPs

Als „ausreichend informative Marker“ für die zu untersuchende Rinderpopulation werden im Folgenden die SNPs bezeichnet, deren Allele aus der F₂-Generation sich auf die Individuen der F₀-Generation zurückverfolgen lassen, ohne dass dabei die jeweiligen Allele des F₀-Tieres unterscheidbar sein müssen. „Teilinformativ“ in einer Familie der F₂-Generation ist z.B. die Allelkonstellationen (c/c) und (c/t) der F₁-Tiere, die zur Zucht für die F₂-Familie miteinander gekreuzt wurden.

Von 15 SNPs in den Genen waren von 7 Elternpaaren der F₁-Generation zwei ausreichend informativ, d.h., die N'Damas und Borans der F₀-Generation sind beide unterschiedlich homozygot für die Allele. Z.B. gilt für DMT1, dass die N'Damas den Genotyp g/g zeigen, die Borans den Genotyp c/c. In dem Genfragment LALBA zeigen die N'Damas den Genotyp a/a, die Borans g/g. Weiterhin waren einzelne Familien bei den Genen CD9, INTB7 und SYB ausreichend informativ. Teilinformativität fand sich in einzelnen Familien bei den Genen SOCS2, MIP, MGF1, IGF1, sowie LALBA und CD9.

Nur für die STS-Marker STS1, STS5 und STS12 wurde bei einzelnen Großelternpaaren ausreichende Informativität gefunden. Teilinformativität wurde dagegen bei mehreren Großelternpaaren für die Marker STS1, STS6, STS8, STS11, STS12, STS14 und STS15 gefunden. Bei anschließender Betrachtung der Informativität in der F_1 -Generation wurde jedoch festgestellt, dass nur in einigen wenigen Fällen das Allel, das die Teilinformativität liefert, geerbt wurde. Auf die Genotypisierung der F_2 -Generation mit den STS-Markern wurde verzichtet, da nur wenig Information aus diesen Markern für die anschließende QTL-Analyse erwartet wurde.

3.6.2 Genotypenbestimmung für informative SNPs und Mikrosatelliten in den Rinderfamilien

Für die Genotypenbestimmung wurden SNPs und Mikrosatelliten ausgewählt, die auf Chromosom *BTA5* in der QTL-Region lagen. Es wurden bereits publizierte Mikrosatelliten aus Kopplungskarten (z.B. <http://www.marc.usda.gov>; siehe Anhang) ausgewählt, deren cM-Positionen bereits bekannt waren, sowie der neu gefundene Marker STS16, der aus der segmentspezifischen Bibliothek stammt.

Die in der Rinderpopulation ausreichend und teilinformativen SNPs der Genfragmente wurden nach PCR und anschließendem Restriktionsverdau der PCR-Produkte durch unterschiedliche Restriktionsfragmentmuster (PCR-RFLP, siehe Kapitel 2.2.10) dargestellt. Für die SNPs geeignete Restriktionsenzyme wurden mit Hilfe des Computerprogramms DNASIS gesucht, auf die jeweiligen PCR-Produkte aller Tiere der Rinderfamilien angewandt und ausgewertet. Die Restriktionsmuster der Typ-I-Marker, von denen anschließend die Genotypen aller Tiere in der Rinderpopulation durch RFLP bestimmt wurden, sind in Tabelle 3-10 dargestellt. In Abbildung 3-6 werden exemplarisch an einem Elternpaar aus der F_1 -Generation und deren Nachkommen [Familie 3] die nach Verdau entstandenen Restriktionsfragmentmuster am Beispiel des Genfragments CD9 dargestellt. Das Genfragment CD9 (468bp) ist teilinformativ und zeigt nach Verdau mit dem Enzym *BsrI* bis zu vier Banden, wobei die kleinste Bande von 53bp im Gelbild kaum zu erkennen ist. Die 225bp große Bande zeigt den SNP, der die Teilinformativität in den Familien der F_2 -Generation verursacht.

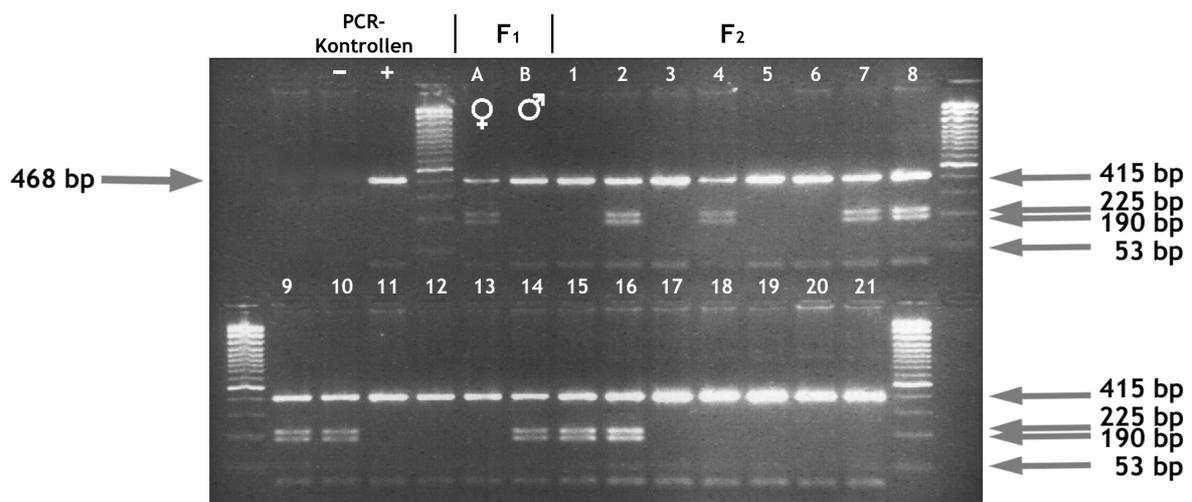


Abbildung 3-6:

Restriktionsfragmentmuster des Genfragments CD9 der Familie 3 in der F₂-Generation nach einem Verdau mit *Bsr*I.

Durch den Verdau entstehen bis zu vier Banden, wobei die kleinste Bande im Gelbild nur schwach erkennbar ist. Die Ziffern 1-21 kennzeichnen die Nachkommen in der F₂-Generation. Die Symbole ♀ / ♂ stellen das Muttertier bzw. Vatertier der F₁-Generation dar.

Da sich keiner der SNPs der neu ermittelten STS-Marker aufgrund des Informativitätsgrads in den Familien für eine genotypische Bestimmung eignete, wurde für die Genotypisierung auf Mikrosatelliten zurückgegriffen. Diese wurden ihrer centiMorgan-Position entsprechend aus publizierten Kopplungskarten ausgewählt. Alle Tiere der Rinderpopulation wurden mit ihnen genotypisiert. Dies erfolgte mit Hilfe der Bestimmung der Fragmentlängen der Mikrosatellitenallele in hochauflösenden denaturierenden Acrylamidgelen (siehe Kapitel 2.2.11).

Tabelle 3-12: Mikrosatelliten, die im Rahmen dieser Arbeit zur Genotypisierung der Tiere der Rinderfamilie herangezogen wurden, mit Angaben zu ihrer Position auf dem Chromosom *BTA5* in centiMorgan (cM), sowie der gefundenen Größen der Allele in Basenpaaren (bp):

Mikrosatellit	cM-Position auf <i>BTA5</i>	Allelgröße in bp
STS16	?	182, 184, 194, 196, 200, 201
BMS1248	88.4cM	124, 132, 136, 138, 140, 142, 150
BM6026	6.7cM	158, 164, 166
BR2936	63cM	141, 143, 161, 163, 165
BM1819	77.6cM	116, 118, 122, 124, 126, 128
BM315	100.1cM	111, 117, 119, 127, 129, 135, 161, 163

3.6.2.1 Informativität der für die Genotypisierung benutzten SNPs und Mikrosatelliten in der F₂-Generation

Insgesamt wurden die Genotypen der 3 Generationen der Rinderpopulation mit 23 Markern bestimmt. Elf Mikrosatelliten wurden in der Arbeitsgruppe von O. Hanotte im ILRI/Nairobi analysiert. Für weitere 6 Mikrosatelliten (Tabelle 3-12) und 6 SNPs (Tabelle 3-10), die in den Genen gefunden wurden, ist während der hier dargestellten Arbeit am BNI/Hamburg genotypisiert worden. Der Informativitätsgrad war innerhalb der Familien der F₂-Generation nicht gleich und ist in Tabelle 3-13 dargestellt.

Tabelle 3-13: Anzahl ausreichend informativer, teilinformativer und nicht informativer Marker pro Familie in der F₂-Generation der untersuchten Rinderfamilie.

F ₂ -Familien	Informativität der Marker in der F ₂ -Generation		
	ausreichend informativ	teilinformativ	nicht informativ
Familie 1	18 Marker	4 Marker	1 Marker
Familie 2	18 Marker	2 Marker	3 Marker
Familie 3	16 Marker	2 Marker	5 Marker
Familie 4	16 Marker	3 Marker	4 Marker
Familie 5	17 Marker	0 Marker	6 Marker
Familie 6	13 Marker	4 Marker	6 Marker
Familie 7	11 Marker	7 Marker	5 Marker

In keiner der Familien der F₂-Generation waren alle 23 Marker informativ. In jeder Familie ließen sich jedoch bei mindestens 17 Markern ein oder beide Allele des Markers auf die entsprechenden Allele der Grosseltern zweifelsfrei zurückverfolgen.

3.6.3 Trypanotoleranz-QTL-Neukartierung auf dem Chromosom *BTA5*

Für die QTL-Neukartierung auf dem Chromosom *BTA5* wurden die Genotypen der F₂-Generation eingesetzt, die mit folgenden Markern ermittelt wurden:

Gene: DMT1, ITGB7, VDR, LALBA, LYZ, CD9.

Mikrosatelliten: *ILSTS42*, *BP1*, *AGLA293*, *BM321*, *BL37*, *BR2936*, *ETH10*, *BM1819*,
BMS1248, *STS16*, *BMS315*, *ETH2*, *BM2830*, *MAF48*, *ETH152*.

Die den Phänotyp Trypanotoleranz beschreibenden Merkmale sind in drei Gruppen eingeteilt: Parasitämie, Anämie und Gewichtsverlust während der Infektion mit Trypanosomen. Diese Merkmale sind in 16 sie genauer beschreibende Parameter aufgeteilt, die in Kapitel 7.4 näher beschrieben sind.

Zur Computer-Analyse wurde das Computer-Programm GeneHunter Version 2.0 beta eingesetzt. Die dafür erforderliche Aufteilung der sieben Familien der F₂-Generation in kleinere Subfamilien wurde durch ein zusätzlich geschriebenes Computer-Programm von B. Müller-Myhsok (unpubliziert; siehe Kapitel 2.2.12) erreicht. Es wurden 2267 Geschwisterpaare innerhalb der 7 Familien gebildet. Jedem Geschwisterpaar wurden seine Eltern (F₁-Generation) und Grosseltern (F₀-Generation) zugeordnet und bildeten so eine sechsköpfige Subfamilie.

Für die Phänotypdaten wurde keine Verteilungsfunktion vorausgesetzt, deshalb ist die hier vorliegende Analyse eine nicht-parametrische Analyse. Eine Überprüfung, ob die ermittelten Genotypen der F₂-Generation die Reihenfolge der Mikrosatelliten und Gene, wie sie in den RH-Karten bestimmt wurden, bestätigen, wurde durchgeführt. Anschließend erfolgte die QTL-Analyse.

In der F₂-Generation wurde kein signifikanter QTL für Trypanotoleranz ermittelt. Die drei Merkmale Parasitämie, Anämie und Gewichtsverlust, die das Krankheitsbild der Trypanosomiasis phänotypisch erfassen (siehe Kapitel 7.4) zeigten in einigen, in keinem Fall in allen Familien der F₂-Generation Kopplung mit deren Genotypen:

1. Einer der Phänotypen, die die Parasitämie beschreiben, zeigte in fünf von sieben Familien Kopplung zum Genotyp. In vier von den 5 Familien wurde die Kopplung in der Region zwischen den Mikrosatelliten *AGLA293* (32cM*) und *BR2936* (63cM*) gefunden. In Familie 5 zeigt im Gegensatz dazu die Region zwischen dem Typ-I-Marker Lysozym (*BTA5q23*) und dem Mikrosatelliten *BM1829* (77.6cM*) Kopplung zu diesem Phänotyp. [* centiMorgan-Angaben: <http://www.marc.usda.gov>]
2. In je drei von sieben Familien der F₂-Generation wurde für Phänotypen, die die Anämie und den Gewichtsverlust während des Krankheitsverlaufes beschreiben, Kopplung zum Genotyp nachgewiesen.
3. In jeweils zwei von sieben Familien wurde Kopplung für weitere die Anämie betreffenden Phänotypen ermittelt. Keiner der Phänotypen war jedoch bei den beiden Familien mit den gleichen Markern assoziiert, d.h., der gleiche Phänotyp koppelt in unterschiedlichen Familien mit unterschiedlichen Chromosomenregionen.
4. Einer das Körpergewicht beschreibender Phänotyp zeigte ebenfalls zu zwei der sieben Familien Kopplung. Während in der Familie 1 drei Regionen Kopplung zu dem Phänotyp aufwiesen, war in Familie 2 nur eine Region zu finden.
5. In je einer der sieben Familien wurde Kopplung zu weiteren die Anämie beschreibenden Phänotypen gefunden.
6. Vier der 16 Phänotypen zeigten keine Kopplung zu den Genotypen der Tiere der F₂-Generation.

In Tabelle 3-14 wird dargestellt, welcher der Phänotypen zu einer oder mehreren Familien der F₂-Generation Kopplung zeigt. Dabei fällt auf, dass in Familie 3 keiner der Phänotypen Kopplung zum Genotyp zeigt, in Familie 1 dagegen zeigen neun von 16 Phänotypen einen Effekt.

Tabelle 3-14 stellt dar, welche den Trypanotoleranz-Phänotyp beschreibenden Parameter Kopplung auf dem Chromosom *BTA5* in den Familien der F₂-Generation der untersuchten Rinderpopulation aufweisen. Grau hinterlegte Zeilen: Phänotypen, die in mindestens drei von sieben Familien Kopplung zeigen.

Phänotypen		Familie 1	Familie 2	Familie 3	Familie 4	Familie 5	Familie 6	Familie 7
Hämatokrit	PCV I					x		
	PCV M							x
	PCV F	x			x			
	PCV I-F	x	x					
	PCV I-M					x		x
	PCVF-M	x						
	PCV V	x	x			x		
	PCVD100							
	PCVD150	x				x		x
	Körpergewicht	BW I	x	x		x		
BW F/I		x	x					
BW mean		x	x		x			
BWD150								
Parasitämie	PAR Ln	x	x			x	x	x
	Ln PAR							
	DR 60-150							

PCV=*packed cell volume* (Hämatokrit); BW=*body weight* (Körpergewicht); PAR=*parasitaemia* (Parasitämie); DR=*detection rate* (Detektionsrate); F=*final* (am Ende der Infektion gemessen); I=*initial* (am Anfang der Infektion gemessen); V=*variance* (Varianz im Verlauf der Infektion); M=*minimum* (Minimumwert); D=*day* (Tag); Ln=*natural logarithm* (natürlicher Logarithmus); Mean=*mean* (durchschnittlicher Wert)

Eine genauere Beschreibung der Phänotyp-Parameter ist im Anhang der Arbeit aufgeführt (siehe Kapitel 7.4).

4 Diskussion

Für Kopplungsanalysen zur Identifizierung chromosomaler Regionen, die gekoppelt mit einem gewünschten Phänotyp segregieren, werden physikalische und genetische Genkarten benötigt. Das Ziel einer solchen Untersuchung kann die Identifikation von Genen, die diesen Phänotyp bestimmen oder beeinflussen, oder die Identifikation von anonymen Markern sein, die mit dem Phänotyp kosegregieren.

Die Identifikation von solchen kosegregierenden anonymen Markern wird in der Tierzucht bereits erfolgreich für markergestützte Selektion (MAS) genutzt (Beck et al., 2000; Dentine, 1999; Willam, 2001). Bedingung hierfür ist, dass Markerallele gefunden werden, die immer mit dem gewünschten Phänotyp segregieren. In Kreuzungen trypanotoleranter, aber wirtschaftlich wenig produktiver Rinderrassen mit Rindern suszeptibler, dafür aber wirtschaftlich bedeutenderer Rassen kann die Segregation der gewünschten Phänotypen Trypanotoleranz und wirtschaftliche Produktivität durch deren Kopplung mit spezifischen Markerallelen in der Nachkommenschaft früh erkannt werden. Dies setzt jedoch neben einer QTL-Region eine hohe Markerdichte in dieser voraus sowie die stabile Segregation der Markerallele mit den gewünschten Phänotypen.

Zur physikalischen Feinkartierung von Chromosom *BTA5*, insbesondere der QTL-Region für Trypanotoleranz, wurden neue Marker benötigt. Typ-I-Marker wurden dafür durch vergleichende Genomanalysen ermittelt. Konservierte syntänische Gruppen zwischen Rind, Mensch und Maus halfen, positionelle Kandidatengene zu bestimmen. Die große Anzahl an Kandidatengenen wurde eingeschränkt, indem als zusätzliches Kriterium die Funktion der Gene betrachtet wurde. Es wurden insgesamt 27 Gene ausgewählt, von denen 24 auf *BTA5* kartiert wurden.

Je nach Art der Typ-II-Marker, die man für Kartierungen einsetzen will, stehen unterschiedliche Bibliotheken zur Isolierung zur Verfügung (Stone et al., 1995; Kirkpatrick et al., 1995; Ambady et al., 2001, Rubin, 2001; Hills et al., 1999). So lassen sich z.B. Mikrosatelliten aus sogenannten „angereicherten“ Banken, mikrodissezierten Chromosomen-Banken oder aus YAC- und BAC-Klonen ableiten. Mikrosatelliten sind zwar im Gegensatz zu z.B. STS (sequenzmarkierende Stellen) hochpolymorph, kommen aber durchschnittlich nur alle 10kb vor (Primrose, 1996).

Um gezielt mehrere Marker für die 70cM große QTL-Region zu isolieren, wurde eine zur Verfügung stehende segmentspezifische Bibliothek von *BTA5* eingesetzt. Diese etablierte Methode wurde erfolgreich eingesetzt, um STS zu identifizieren. Der Nachweis von STS im Genom erfolgt mit Hilfe von PCR (Yu et al., 1995; Behrens et al., 1997). Die Bestimmung ihrer subchromosomalen Position unter Verwendung von RH-Panels ist leicht durchführbar. Zusätzlich wurde ein Mikrosatellit sowie ein Genfragment aus der Bibliothek isoliert.

Insgesamt wurden 175 Klone isoliert und sequenziert. Sechzehn STS konnten davon abgeleitet werden. Der weitaus größte Anteil der 175 Klone trug identische oder repetitive Inserts. Generell betrug die Insertgröße selten mehr als 150-200bp, was auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde, die mit vergleichbarem Material arbeiteten (Behrens et al., 1997; Kao et al., 1996; Yu et al., 1995). Der Einsatz von chromosomensegment-spezifischen Bibliotheken, zur Definition neuer genetischer Marker konzipiert (z.B. Wesley et al., 1990; Weikard et al., 1997; Chaudhary et al., 1998), erwies sich als sehr aufwändig im Verhältnis zur Ausbeute an neuen Markern. Die geringe Ausbeute an Markern läßt sich auf einige entscheidende Punkte zurückführen:

Ein grundsätzlicher Nachteil der Mikrosektion ist, dass mit sehr wenig Ausgangsmaterial gearbeitet werden muss. Die DNA der Metaphasechromosomen liegt eng verbunden mit Proteinen im verdichteten Zustand vor. Somit ist ein hoher Anteil der mikrodisezierten DNA zunächst wenig zugänglich für PCR-Amplifikationen. Protein-zerstörende Vorbehandlungen der DNA wären notwendig, bergen aber das Risiko, zu hohen DNA-Verlusten oder zu Kontaminationen zu führen. Aus diesem Grund wird das mikrodisezierte Material direkt für die Amplifikation mit Zufallsprimern eingesetzt. Dies erfolgte dann nicht, wie gewünscht, gleichmäßig an der gesamten DNA. Wenige, oft sehr kurze DNA-Bereiche wurden in den ersten PCR-Zyklen so stark vervielfältigt, dass sie den überwiegenden Anteil des Amplifikates ausmachen.

Für die Identifikation von weiteren Typ-II-Markern würde diese Methode nicht wieder in Einsatz kommen. Erfolgversprechender wäre z.B. die Methode, Mikrosatelliten aus DNA-Banken mit Hilfe von Sonden zu isolieren. Mikrosatelliten haben den Vorteil neben der physikalischen Kartierung auch für die genetische Kartierung einsetzbar zu sein, da sie hochpolymorph sind.

Die Untersuchung somatischer Hybridzelllinien lässt Aussagen über die Zugehörigkeit von Genen zu einem Chromosom zu (Abbott und Povey, 1991; Lindgren et al., 2001; Lahbib-Mansais et al., 2000). Sechzehn bisher nicht im Rindergenom kartierte Gene wurden mit dieser Methode einem Chromosom zugewiesen.

Eines dieser 16 Gene, NF-YB, wurde mit einer Wahrscheinlichkeit von nur 80% entweder Chromosom *BTA5* oder Chromosom *BTA24* zugeordnet. NF-YB ist ein Gen der NF-Y-Gengruppe, deren Untereinheiten über ihre Funktion bestimmen. Die NF-Y-Einheiten und deren Untereinheiten A, B und C sind unter den höheren Vertebraten hoch konserviert (Aminosäuresequenzübereinstimmung der Proteine >99% bei Mensch, Maus und Huhn; Li et al., 1991; Sinha et al., 1996), was vermuten ließ, dass mit dem verwendeten Primerpaar eventuell neben dem Gen NF-YB die Gene NF-YA und /oder NF-YC in der PCR amplifiziert wurde. Die Gene NF-YA und NF-YC sind beim Menschen auf verschiedenen Chromosomen (*HSA6p21* und *HSA1p32*) kartiert (Sinha et al., 1996). Deren konservierte syntänische Gruppen lägen beim Rind auf Chromosom *BTA23* bzw. *BTA2* und *BTA3* (Solinas-Toldo et al., 1995). Neben PCR-Signalen für *BTA5* wären auch Signale für die Chromosomen *BTA23*, bzw. *BTA2* und/oder *BTA3* zu erwarten, was jedoch nicht der Fall war. Eine Mitamplifikation der Gene NF-YA und NF-YC wurde deshalb ausgeschlossen. Die Amplifikation eines Pseudogens oder eines zusätzlich vorliegenden nicht-funktionsfähigen Genfragmentes von NF-YB, welches sich auf dem Chromosom *BTA24* befindet, muss angenommen werden.

Die PCR-Amplifikation der Gene *POLE*, *PPP1CC* und *UNG* aus der DNA der somatischen Hybridzelllinien ergab PCR-Signale, die eine Lage der Gene auf Chromosom *BTA5* nicht sicher zuließen. Diese drei Gene wurden auf *BTA5* vermutet, da sie sich beim Menschen auf Chromosom *HSA12* befinden und das Gen *POLE* bei der Maus auf Chromosom *MMU5* nahe *VDR* und *PTPRB* bei 56.0cM-58.0cM liegt. *VDR* und *PTPRB* wurden Chromosom *BTA5* zweifelsfrei zugewiesen. *PPP1CC* und *UNG* wurden *BTA17* zugeordnet. Eine große Anzahl der Gene, die auf *HSA12* liegen, wurden auf *BTA5*, z.T. aber auch auf *BTA17* lokalisiert. Eine konserviert syntänische Gruppe zwischen *HSA12* und *BTA17* ist bekannt (Solinas-Toldo et al., 1995). Die Kartierung von *POLE* auf *BTA17* ist sehr unsicher und lässt keinen endgültigen Schluss über die tatsächliche Lage des Gens im Genom zu. Ähnlich wie bei dem Gen NF-YB muss für die genaue Zuordnung zu einem Chromosom ausgeschlossen werden, dass die Primer z.B. ein Pseudogen oder andere dem Gen verwandte Sequenzen mitamplifiziert.

Das Kartieren von Markern auf traditionellem Wege mit Hilfe von somatischen Hybridzelllinien oder FISH-Analysen führt nicht zu einer genaueren physikalischen Karte, die benötigt wird, um mehr Information über eine chromosomale Region zu erhalten. Die Kartierung von Genen und Markern beim Rind erfolgt deshalb häufig über mindestens eines der beiden Hybridzelllinienkonstrukte BovRH5 und BovRH12 (Lahbib-Mansais et al., 2000; Band et al., 2000; Barendse et al., 2000; Amarante et al., 2000; Band et al., 1998; Yang et al., 1998, Yang und Womack, 1998; Womack et al., 1997).

Die Kartierung der Loci dieser Arbeit wurde deshalb ebenfalls unter Verwendung der BovRH-Panels und anschließender statistischer Analyse der Ergebnisse durchgeführt.

Die Programme RHMAP und RH-MAPPER werden für die statistische Auswertung der aus den BovRH5- und BovRH12-Panels erhaltenen Daten am häufigsten eingesetzt (Yang und Womack, 1998; Gu et al., 1999; Rexroad et al., 1999; Band et al., 1998; Ozawa et al., 2000). Die Wahl des Computer-Programms kann einen Einfluss auf das Kartierungsergebnis haben, da die erhobenen Daten aus den Experimenten in den Programmen unterschiedlich verarbeitet werden (Barendse et al., 2000; Hukriede et al., 1999).

Für diese Arbeit wurde das Programm RHMAP ausgewählt. Das Programm bietet den Vorteil, dass die eingesetzten Daten auf individuelle Fragestellungen hin analysierbar sind, da verschiedene Bedingungen für die unterschiedlichen Teilprogramme ausgewählt werden können. Zusätzlich wurden durch die Wahl des Programms RHMAP die Ergebnisse mit verschiedenen anderen Arbeiten (z.B. Band et al., 2000) vergleichbar. Trotz der Möglichkeit, das Programm auf die erhobenen Daten und die jeweilige Fragestellung abzustimmen, besteht ein Nachteil darin, dass sich die Datenanalyse auf ein statistisches Modell stützt. Anders als bei genetischen Kopplungskarten, die auf beobachteten Rekombinationshäufigkeiten beruhen, wird hier eine theoretische Kopplung ermittelt.

Für die Anordnung der Loci auf Chromosom *BTA5* wurden zunächst die mit dem BovRH5-Panel erzeugten Daten statistisch analysiert. Fünf große Kopplungsgruppen wurden ermittelt (RH2pt, Teilprogramm von RHMAP). Zunächst wurden die Loci innerhalb der Kopplungsgruppen (KG) mit Hilfe des RHMAP-Programms angeordnet. Anschließend erfolgte eine Anordnung der Gruppen zueinander. Loci, die keiner KG angehörten, wurden durch Herabsetzen der statistischen Stringenz in die entstandene Karte integriert. Der Mikrosatellit *INRA104* z.B. liess sich bei einem Lodscore von 8.0 nicht in die KG2 einordnen. Bei Herabsetzen der geforderten Wahrscheinlichkeit für Kopplung des Locus zu einer KG auf den Lodscore von 7.0 wurde *INRA104* in die KG2 integriert.

Bei dem Vergleich der in dieser Arbeit erstellten RH-Karte mit einer weiteren RH-Karte (Band et al., 2000) und einer genetischen Kopplungskarte (MARC-MAP) zeigten zwei Mikrosatelliten (*BL23* und *BR2936*) innerhalb der Karten unterschiedliche Anordnungen in der Loci-Reihenfolge. Der Vergleich in der Anordnung der Gene zeigt eine unterschiedliche Position für *IGF1* in den beiden RH-Karten. RH-Karten basieren auf der Analyse von PCR-Signalen, die in RH-Panels mit Hilfe markerspezifischer Primer erstellt werden. Eine klare Unterscheidung der PCR-Signale in positive und negative Signale ist nicht immer möglich, wenn ein Primerpaar nicht die notwendige Spezifität für einen Marker zeigt. Die Mikrosatelliten *BL23*, *BR2936* und das Genfragment *IGF1* gaben trotz Optimierung der Primer für die PCR mit der DNA des BovRH5-Panels häufig ein mehrbandiges und unspezifisches PCR-Produkt, was Einfluss auf die Auswertung und anschließende statistische Analyse hatte.

Schon einzelne PCR-Signale haben hohen Einfluss auf die statistische Analyse mit dem Computer-Programm RH-MAP. Dies ist ein wichtiger Grund dafür, theoretisch ermittelte Kopplungskarten nicht unabhängig von genetisch ermittelten Kopplungskarten zu betrachten (Barendse et al., 2000). Die Verwendung verschiedener Primer für einen Marker, aber auch die Qualität der DNA des verwendeten RH-Panels, verschiedene PCR-Geräte oder die Stringenz in der Auswertung der PCR-Signale beeinflussen neben dem statistischen Analyse-Programm die Kartierungsergebnisse.

Die unterschiedlichen Distanzen der einzelnen Loci zueinander in den beiden RH-Karten lässt sich auf die unterschiedliche Anzahl von den insgesamt kartierten Loci zurückführen.

Während Band et al. über 80 Loci auf *BTA5* kartiert haben, von denen sich zirka zwanzig auf mehreren positionell kaum auftrennbaren Positionen befanden, wurden in dieser Arbeit 41 Loci mit Hilfe des BovRH5-Panels kartiert, von denen sich die Position von 2 Loci (*LALBA* und *CCNT1*) in der BovRH5-Karte nicht auftrennen ließen. Die Auflösung von eng beieinanderliegenden Loci ist mit dem BovRH5-Panel nicht möglich, da dafür die Bruchfrequenz der Chromosomen nicht hoch genug ist. Zwischen zwei Loci muss einmal ein Bruch stattgefunden haben, um eine ermittelbare Distanz errechnen zu können. Diese Distanzen zwischen Loci addieren sich auf, weswegen bei einer höheren Anzahl an kartierten Loci eine etwas größere RH-Karte zu erwarten ist.

Die über das BovRH12-Panel bestimmten Positionen der STS-Marker, des Mikrosatelliten *STS16* und des Genfragments *CDK2* stimmten weitgehend mit der zytogenetisch ermittelten

Position der fragmentspezifischen Bibliothek von *BTA5q21-q24* überein. Elf der 16 STS-Marker lagen in dem Bereich zwischen *BL37* und *ETH10*, also bei *BTA5q22-q25*. Die STS-Marker STS3, STS13 und das Genfragment CDK2 lagen ausserhalb dieser Region, nahe dem Gen VWF und dem Mikrosatelliten *ETH2* (beide zytogenetisch auf *BTA5q35* kartiert). Dieser Befund kann auf die Ungenauigkeit der Methode bei der Erstellung der segmentspezifischen Bibliothek zurückgeführt werden, da häufig gleiche Abschnitte mehrerer Chromosomen gewonnen werden müssen, um eine ausreichende Menge an Ausgangsmaterial für die Herstellung einer solchen Bibliothek zu erhalten (Ludecke et al., 1989; Goldammer et al., 1999). Ungenauigkeiten bei der Mikrosektion der einzelnen Chromosomen sind nicht auszuschließen. Grundsätzlich kann aber gesagt werden, dass trotz der geringen Ausbeute an Markern aus der chromosomensegmentspezifischen Bibliothek die Methode geeignet ist, STS-Marker mit hoher Spezifität in der Region zu isolieren.

Mit dem BovRH12-Panel wurden zusätzlich die Gene kartiert, deren Positionen auf dem Chromosom in der QTL-Region für Trypanotoleranz lagen. In der BovRH12-Karte nimmt die Gengruppe MIP-PRIM-GALGT innerhalb der kartierten Gene eine andere Position ein als in der BovRH5-Karte. Neben der Tatsache, dass die Chromosomenbruchstücke im BovRH5-Panel zu groß waren, um eine genauere Position ermitteln zu können, muss hier auch berücksichtigt werden, dass in dem höher auflösenden BovRH12-Panel weitaus mehr Marker in der unmittelbaren Umgebung dieser Gengruppe lokalisiert wurden. Je mehr Marker in eine RH-MAP-Analyse eingehen, desto genauer können Abstände und Anordnungen zueinander bestimmt werden.

Positionstausche zweier Loci in den RH-Karten (*BM2830* und *MAF48*, sowie innerhalb der Gengruppe MIP, PRIM und GALGT) sind in RH-Karten mit unterschiedlicher Auflösung zu erwarten. Womack (pers. Mitteilung) beschreibt das Auflösungsvermögen des BovRH5-Panels auf zirka 10cM. D.h., dass Marker, die mit dem BovRH5-Panel untersucht wurden und in der RH-MAP-Analyse Kopplung zeigten, maximal 10cM auseinander liegen sollen. Die Dosis der Gamma-Strahlung, die im BovRH12-Panel angewandt wurde, ist mehr als doppelt so hoch, entsprechend sind kleinere Bruchstücke der Chromosomen und eine größere Anzahl an Kopplungsgruppen zu erwarten. Loci, die im BovRH5-Panel zusammen auf einem Chromosomenbruchstück vorliegen, können im BovRH12-Panel auf mehrere Bruchstücke verteilt sein. Deutlich wird dies bei der Gengruppe PRKAG1, CCNT1, VDR und PTPRB. Die Positionen von LALBA und CCNT1 lassen sich in der BovRH5-Karte nicht auftrennen. Ihre

Distanz zu PRKAG1 und VDR ist ähnlich ($3cR_{5000}$ und $3.95cR_{5000}$). In der BovRH12-Karte wurde dagegen eine Distanz von $3.12cR_{12000}$ zwischen den Genen LALBA und CCNT1 errechnet. PRKAG1 liegt hier nur $2.49cR_{12000}$ von LALBA entfernt. Hier wird deutlich, dass zwar über das gesamte Chromosom gesehen eine gleichmäßige Bruchfrequenz durch die Gamma-Strahlung vorliegt, diese Bruchstücke trotzdem nicht alle gleichmäßig groß sind. Die Bruchstellen, die zufällig im BovRH5-Panel vorliegen, liegen nicht zwangsläufig auch im BovRH12-Panel vor. Die Distanzen zwischen den Loci werden über das gemeinsame bzw. nicht gemeinsame Auftreten auf Chromosomenbruchstücken ermittelt. Sie sind dadurch in den BovRH5- und BovRH12-Karten nicht immer proportional.

Die im BovRH12-Panel kartierten Loci ordneten sich relativ gleichmäßig auf der RH-Karte an. Die STS-Marker halfen, Bereiche zu überbrücken, in denen nur wenige andere Marker verfügbar waren. Sie dienen als wichtige Gerüstmarker für den Einbau weiterer Loci, da sie Distanzen zwischen Loci kleiner machen und somit die Kartierung sehr viel genauer werden lassen. Da sie nicht polymorph sind, lassen sie jedoch keinen weiteren Einsatz in Segregationsanalysen und Zuchtprogrammen bei Nutztieren zu.

Zwei neu dem Chromosom *BTA5* zugewiesenen Gene ließen die Annahme einer neuen konservierten syntänischen Gruppe zwischen Rind und Maus zu: Die Gene VDR und PTPRB liegen beim Menschen auf Chromosom *HSA12q12-14* und *HSA12q15-21*, in unmittelbarer Nähe der Gene *ITGB7*, *DMT1* etc.. Letztere sind bei der Maus auf Chromosom *MMU15* nahe benachbart zu finden. VDR und PTPRB dagegen befinden sich bei der Maus auf *MMU5*. Konservierte Syntänie zwischen den Chromosomen *MMU5* und *BTA5* ist bisher nicht bekannt gewesen. Diese Identifikation der neuen konservierten syntänischen Gruppe ist ein wichtiger Beitrag zur Kartierung des bovinen Genoms. Kenntnisse über konservierte syntänische Gruppen zwischen verschiedenen Spezies helfen z.B. dabei, Chromosomenumordnungen bei der evolutionären Karyotypentwicklung der Vertebraten festzustellen und zu vergleichen (O'Brien et al., 1997; Rettenberger et al., 1995; Wienberg und Stanyon, 1997). Dies dient u.a. der Bestimmung phylogenetischer Stammbäume. Die Identifikation von Genen und deren Homologen bei anderen Spezies lässt Studien über homologe Krankheiten und ihre Therapien zu.

Für die QTL-Kartierung der Trypanotoleranz auf *BTA5* beim Rind ist diese Gruppe von Interesse, da diese Gene (VDR, PTPRB) an einer Seite der Region liegen, für die bei der Maus ein QTL für Trypanotoleranz ermittelt wurde. Diese bei der Maus als „*Tir2*“

bezeichnete QTL-Region ist mittlerweile in der F₆-Generation auf wenige centiMorgan eingeeengt (Iraqi et al., 2000). Ein Großteil der Gene ist im Mausgenom bereits kartiert, und ihre cM-Positionen sind bekannt. Weitere vergleichende Kartierungen in der Region der neuen konservierten syntänischen Gruppe bei Rind und Maus würden weitere Gene in der Region identifizieren und eine Auswahl an funktionellen Kandidatengen zulasen.

Die Tatsache, dass in verschiedenen Spezies homologe Gene in QTL-Regionen für den gleichen Phänotyp gefunden werden, lässt zumindest nicht ausschließen, dass diese Gene in einem mehr oder weniger starken Umfang an der Ausprägung des Merkmals beteiligt sind. Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der Region ist ein anderes Projekt, dass sich mit der QTL-Kartierung von Malaria als parasitäre Erkrankung bei der Maus beschäftigt (Iraqi, pers. Mitteilung). Auch hier scheinen Gene des Mauschromosoms *MMU5* involviert zu sein. Positionsklonierungen werden helfen, die Gene in dieser Region zu identifizieren. Eine sukzessive Einengung der konservierten syntänischen Gruppe resultiert möglicherweise in der Identifizierung eines oder mehrerer Kandidatengene. Eine anschließende Untersuchung der Funktion der Gene kann Aufschluss geben, ob sie eine Bedeutung für die Trypanotoleranz bzw. die Suszeptibilität haben.

Unter Verwendung der FISH-Methode wurde die neu identifizierte Gruppe konservierter Syntänie zwischen Mensch, Maus und Rind zyto-genetisch bestätigt. Die Gruppe besteht bisher aus den Genen VDR und PTPRB. CCNT1 und PRKAG1 wurden, da sie beim Menschen und der Maus in Nachbarschaft zu VDR und PTPRB liegen, ebenfalls in diese Analyse einbezogen, um deren zyto-genetische Lage zu der der zwei anderen Gene im bovinen Genom zu bestimmen. Die FISH-Analyse lokalisierte die Gene VDR, PTPRB und PRKAG1 in der Region *BTA5q11-14*. PRKAG1 ist dagegen von Sazanov et al. (1999) auf *BTA5q21-22* und von Shamsadin et al. (2001) bei der Maus auf Chromosom *MMU15* kartiert worden. Bei zyto-genetischen Kartierungen mit Hilfe von FISH-Analysen markiert die dabei eingesetzte Fluoreszenz den entsprechenden Bereich des Gens auf dem Chromosom. Die Fluoreszenz überstrahlt aber auch unmittelbar benachbarte nicht markierte Regionen auf dem Chromosom. Auf Chromosom *BTA5* folgt die q21-Bänderung unmittelbar auf q14, weshalb eine scharfe Abgrenzung der Gene untereinander in FISH-Analysen nicht zu erreichen ist. Bei Metaphasechromosomen, die bei der FISH-Analyse verwendet werden, wird die q-Bänderung mit Hilfe der Giemsa- oder Quinacrin-Färbung dargestellt, wobei die kleinste sichtbare Chromosomenbande dabei immer noch mehr als eine Millionen Basenpaare enthält (Knippers, 2001). Ein genauer Rückschluss von der fluoreszierenden Region des Chromosoms auf die entsprechen-

den q-Banden ist oft nicht einfach. Eine Lagebestimmung über den Karyotyp kann demnach nur als grob eingestuft werden.

CCNT1 zeigte neben deutlichen Signalen für die Region *BTA5q11-14* zusätzlich unspezifische Signale. Es ist schwierig zu entscheiden, ob es sich hier um Verunreinigungen oder um zusätzliche echte Signale handelt. Da CCNT1 mit Hilfe der somatischen Zelllinien sicher dem Chromosom *BTA5* zugewiesen wurde, ist auszuschließen, dass diese zusätzlichen Signale auf ungenügend spezifische Primer für CCNT1 zurückzuführen sind. Um Sonden für den zytogenetischen Nachweis der Gene durch FISH herzustellen, wurden von den Genfragmenten CCNT1, VDR, PTPRB und PRKAG1 aus einer BAC-Bank Klone isoliert, deren Inserts mit den genspezifischen Primerpaaren eindeutige PCR-Signale gaben. Besteht ein Insert eines Klones anstatt aus einem Fragment aus Fragmenten zweier Rinderchromosomen, wird auch die daraus hergestellte Sonde bei der FISH anstatt nur eines Chromosomes zwei Chromosomen markieren. Zhu et al. (1999) beschreiben für die von ihnen erstellte und für diese Arbeit verwendete bovine BAC-Bank Chimärenbildung mit einer Frequenz von ungefähr 6%. Chimäre BAC-Klone liegen also in der bovinen BAC-Bank vor, und es muss angenommen werden, dass aus einem von ihnen die DNA zur Sondenherstellung von CCNT1 gewonnen wurde.

Abweichungen in der Genanordnung zwischen Spezies sind häufig zu finden (Andersson et al., 1996). Besonders deutlich werden diese Abweichungen zwischen den Nagetieren und anderen Säugetierordnungen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der Phylogenese die Ordnung der Nagetiere schon früh von den anderen Säugetieren abgetrennt wurde, bevor sich diese in weitere Ordnungen aufspalteten (z.B.: Pletcher et al., 2000; Carver und Stubbs, 1997; Al-Majali et al., 1999; Andersson et al., 1996; Blaschke und Rappold, 1997; Bush et al., 1977). Aber auch zwischen nahe verwandten Ordnungen werden Unterschiede beobachtet (z.B.: Aleyasin und Barendse, 1999; Bush et al., 1977; Chowdhary et al., 1996; Echard et al., 1994; Eppig, 1996; Eppig und Nadeau, 1995; Nadeau, 1989).

Während Andersson et al. (1996) Rearrangements innerhalb von Autosomen – abgesehen von den Zentromerregionen – als eher selten beobachtete Ereignisse beschreibt, konnten Umordnungen dieser Art in dieser Arbeit zwischen Mensch und Rind beobachtet werden. Die Gene, die auf *HSA12* in der Region q13 liegen, spalten sich beim Rind in zwei Gruppen auf und wurden dort in inverser Reihenfolge kartiert. Die Gene der Region *HSA12q22-q24* liegen ebenfalls in inverser Anordnung auf *BTA5* vor. Die Anordnung der Gene auf Chromosom

BTA5 entspricht der Translokation einzelner Gene bis hin zur konservierten Syntänie von *HSA12*. Die Gengruppe *NF-E2*, *DMT1*, *ITGB7*, *GPD1* und *PRKAG1* liegt bei der Maus auf *MMU15*. Auch diese Reihenfolge ist – mit einer Translokation (*DMT1*, *ITGB7*) – invers zu *BTA5*. Weitere Umordnungen der Gene dieser Art sind in der konservierten syntänischen Gruppe von *BTA5* zu *MMU10* und *MMU6* zu beobachten. In einigen Regionen ist die Anordnung der Gene zwischen Mensch und Maus ähnlicher als zwischen Mensch und Rind, was darauf schließen lässt, dass speziesspezifische Entwicklungen die Karyotypen veränderten (Rettenberger et al., 1995). Es ist anzunehmen, dass die fortschreitende Feinkartierung mehr solcher Gen-Umordnungen zwischen den Genomen aufdecken wird und die Annahme von Andersson et al. (1996), dass Karyotypen verschiedener Spezies in der Hauptsache reziproke Translokationen sind, dadurch widerlegt werden wird.

Eine konservierte Kopplung von Genen, d.h. die identische Anordnung der Gene innerhalb von Gengruppen bei verschiedenen systematischen Ordnungen, wurde bei den Genen *VDR* und *PTPRB* zwischen Mensch, Maus und Rind gefunden, jedoch ist auch hier anzunehmen, dass weitere Genkartierungen die Anzahl und die Größe von konserviert gekoppelten Gengruppen ständig kleiner machen wird (z.B.: Lyons et al., 1997; Rettenberger et al., 1994; O'Brien et al., 1997).

Bei Mensch und Rind liegt Unklarheit über die konservierten syntänischen Gruppen zwischen den Genen der Gruppe *PRKAG1*, *CCNT1*, *LALBA* und *VDR* zur Maus vor. Die vier Gene liegen beim Menschen auf *HSA12* und Rind auf *BTA5*. *PRKAG1* wurde von Shamsadin et al. (2001) auf *MMU15* kartiert. *LALBA* und *CCNT1* sind beide nicht bei der Maus kartiert. Die Nähe dieser beiden Gene zu *PRKAG1*, aber auch die geringe Distanz zu *VDR* lassen keine Schlüsse auf die Lage der Gene über die Chromosomenzugehörigkeit bei der Maus zu. Die Kartierung der beiden Gene bei der Maus würde helfen, die Ausdehnung der konservierten syntänischen Gruppen zu bestimmen und so weitere Informationen über Genorganisationen zwischen verschiedenen Spezies zu erhalten. Kenntnisse darüber sind eine wichtige Voraussetzung für Positionsklonierungen, wo Gene aufgrund ihrer Position im Genom untersucht werden.

Neben der Erweiterung der physikalischen Karte um neue Gen- und STS-Marker, wurden deren Sequenzen auf Polymorphismen hin untersucht. Bei der Identifikation von SNPs in Gen- oder STS-Markern, die in der F₀-Generation der untersuchten Rinderpopulation zwischen N'Dama- und Boran-Rinder unterscheiden ließen, wurden diese in der F₁- und F₂-Population zur genetischen Kartierung eingesetzt.

Einzelne Nukleotidunterschiede in den kurzen Sequenzen der STS-Marker zwischen den acht N'Dama- und Boran-Rindern der F₀-Generation reichen aus, um innerhalb der F₁- und F₂-Generation informative Marker zu erhalten.

Bei einer sequenzierten Gesamtlänge der Rinder-STS-Marker von 2565bp wurden etwa fünf bis sieben Basenunterschiede zwischen zwei Rindern erwartet. Dieser Wert basiert auf dem Vergleich von SNP-Analysen in anderen Genomen, wobei zu berücksichtigen ist, dass in anderen Genomen unterschiedlich viele Sequenzen untersucht worden sind (Wang et al., 1998; Cargill et al., 1999; Halushka et al., 1999; The International SNP Map Working Group 2001; Brouillette et al., 2000; Shubitowski et al., 2001). Tatsächlich fand sich sogar alle 215bp ein SNP, was zwölf Basenunterschieden zwischen allen Tieren der F₀-Generation entspricht. Eine Untersuchung größerer Populationen wäre notwendig, um bei diesen SNPs zwischen zufälligen Mutationen oder Polymorphismen unterscheiden zu können.

Die einzelnen identifizierten SNPs traten meistens nur bei einzelnen Tieren auf, ließen also keine Unterscheidung der beiden Rassen N'Dama und Boran zu. Für die Genotypisierung der Familien der F₂-Generation und der anschließenden QTL-Kartierung sind diese STS-Marker nicht geeignet, da sie bei zu wenig Individuen informativ sind.

Von 23 Typ-I-Sequenzen enthielten fünf Gensequenzen SNPs, die in der untersuchten F₂-Rinderpopulation in allen Familien informativ waren. Die Genotypen der Tiere der F₂-Rinderpopulation, die mit diesen fünf Typ-I-Markern ermittelt wurden, konnten somit für die abschließende QTL-Analyse eingesetzt werden.

Während bei den STS-Markern etwa alle 215bp ein Basenaustausch beobachtet wurde, wurde bei den Genfragmenten, unabhängig, ob kodierende oder nicht-kodierende Bereiche des Gens vorlagen, etwa alle 500bp ein Nukleotidaustausch festgestellt. Dies liegt etwas unter der durchschnittlichen SNP-Frequenz beim Menschen, bei dem etwa alle 350bp ein SNP im Genom gefunden wird (Halushka et al., 1999, Cargill et al., 1999), wobei auch hier zu berücksichtigen ist, dass für das menschliche Genom weitaus mehr Individuen untersucht wurden. In

einer Gesamtsequenzlänge der untersuchten Genfragmente von 7984bp wurden 16 Basenaustausche zwischen den Individuen der F₀-Rinderpopulation gefunden. Vier der Basenaustausche lagen in kodierenden Sequenzen. Zwei von diesen SNPs veränderten die abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Änderungen in der Aminosäuresequenz betreffen die Gene ITGB7 und SOCS2. ITGB7 ist eines der Zelloberflächenglykoproteine, das z.B. von Leukozyten exprimiert wird und entscheidend an Entzündungsprozessen und Immunantworten mitwirkt. SOCS2 interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne des IGF1 Rezeptors (Dey et al., 1998). Die Änderung von z.B. der an Wasserstoffbrückenbindungen teilnehmenden Aminosäure (Serin) in eine im Protein im allgemeinen nicht reaktive Aminosäure (Phenylalanin) im Gen SOCS2 dürfte eine Veränderung in der Funktion hervorrufen. Bei komplexen Merkmalen wie der Trypanotoleranz wird der Phänotyp keinem einzelnen Genlocus zugeordnet. Geht man von polygener Vererbung aus, kann man annehmen, dass das gleichzeitige Auftreten von Mutationen in mehreren Genen diese Merkmale bestimmt. Die Gene ITGB7 und SOCS2 wären also hinsichtlich ihrer Funktion und der Aminosäuresequenz interessante Kandidaten für die Identifikation der an der Trypanotoleranz beteiligten Gene.

In kodierenden Sequenzen werden beim Menschen etwa 2,5 mal mehr nicht informative SNPs (SNPs, die nicht zum Aminosäureaustausch führen) als Aminosäuresequenz-verändernde SNPs erwartet. Ob das Verhältnis von nicht informativen SNPs zu informativen SNPs in kodierenden Sequenzen bei Rindern generell anders ist, ist nicht weiter untersucht. Keinesfalls reichen die hier vorliegenden Untersuchungen, um eine allgemeine Aussage darüber zu machen. SNPs in nicht-kodierenden Sequenzen können starken Einfluss auf die Genexpression haben, wenn sie z.B. in Promotor-Regionen liegen.

Es wurden keine neuen QTL-Regionen für Trypanotoleranz auf Chromosom *BTA5* ermittelt, obwohl die Markerdichte mehr als verdoppelt und die durchschnittliche Intervallgröße von über 15cM auf zirka 6cM verringert wurde.

Die QTL der vorangegangenen Analyse (siehe Kapitel 1.1.4) bezogen sich auf kombinierte Phänotypen, die sich in ihrem Effekt bestärkten (additiver Effekt). Diese Phänotypen zeigten auch einzeln genommene Kopplung, die jedoch das geforderte Signifikanzniveau von einem Lodscore von 3.0 nicht erreichte. Dieser Schwellenwert basiert darauf, bei einer genomweiten Analyse Kopplung zwischen einem Genotyp und einem den Mendelschen Gesetzen folgenden Phänotyp zu errechnen, ohne die falsch-positiv Rate von 9% zu überschreiten. Allerdings handelt es sich hier um Überlegungen, ein einzelnes Gen zu finden, das den entsprechenden

Phänotyp bewirkt. Bei der Suche nach mehreren Genen, also komplexen Merkmalen, die sich nicht klar erfassen lassen, passt dieses statistische Modell nur noch bedingt. Die analytische Annäherung zur Erfassung von Merkmalkomplexen benötigt vereinfachende Annahmen wie die Normalverteilung der Merkmale oder das Zusammenfassen unabhängig voneinander stattfindender Rekombinationen, was zu falschen Resultaten führen kann.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Analyse komplexer Merkmale besteht in der ungenauen Lokalisierung des QTLs. Da die Beziehung zwischen Geno- und Phänotyp in polygenen Merkmalen weitaus umfangreicher ist als in monogenen, können Rekombinationen zwischen Marker und Loci nicht direkt identifiziert und in Bezug gebracht werden.

In dieser Arbeit wurden innerhalb der untersuchten Familien Unterschiede in der Kosegregation von chromosomalen Regionen, die mit einem Phänotyp gekoppelt ist, festgestellt. Während in der QTL-Analyse von Hanotte zwei Regionen auf Chromosom *BTA5* kartiert wurden, die Kopplung zu einem der Phänotypen der Trypanotoleranz zeigten, konnten diese Regionen in der hier vorliegenden Arbeit und von van der Waaij et al. (2001) nicht bestätigt werden. Auf Chromosom *BTA5* konnte in der vorliegenden Arbeit für einige Subfamilien der F_2 -Generation eine Region ermittelt werden, die mit einem Phänotyp, der die Parasitämie beschreibt, signifikant gekoppelt ist. Diese Kopplung ist nicht durchgehend in allen Familien zu finden. Die QTL-Region umfasst etwa 45cM und beherbergt unter anderem die Gene *PTPRB* und *VDR*, die die neue konservierte syntänische Gruppe zum Mauschromosom *MMU5* bilden. Da diese Gruppe von Genen, wie oben beschrieben, einem der QTL-Bereiche für Trypanotoleranz bei der Maus benachbart ist, gewinnt diese Kopplung zu dem Phänotyp an Bedeutung. Es bestehen jedoch Zweifel an der Signifikanz dieser Kopplung, da genetische Heterogenität in der F_2 -Generation vorliegt. Nicht alle Subfamilien der F_2 -Generation zeigen diese Kopplung und die Kopplung des Phänotypes ist bei den Subfamilien nicht bei den gleichen Markern zu finden.

Die untersuchte Rinder-Population stammte von zwei verschiedenen Gründerpopulationen ab, den westafrikanischen N'Damas und den ostafrikanischen (kenianischen) Boran-Rindern. Die Boran-Rinder (*Bos indicus*) haben ihren Ursprung in Asien, wo sie anderen Evolutionsbedingungen ausgesetzt waren als die *Bos taurus*, deren Entwicklung unabhängig von den *Bos indicus* im vorderasiatischen und europäischen Raum stattfand. N'Dama- und Boran-Rinder sind aus diesen Gründen genetisch verschieden. Zusätzlich stammen die N'Damas aus einer kleineren relativ isoliert lebenden Population, während die Boran-Rinder nach wirt-

schaftlichen Aspekten gezüchtet wurden. Insgesamt bedeutet dies, dass eine relativ hohe Bandbreite sowohl an unterschiedlichen Allelen, als auch an gemeinsamen Allelen der Marker bei Betrachtung beider Arten zu erwarten ist, was es schwer macht, in Genomscans Regionen, die mit einem Phänotyp gekoppelt sind, genau zu lokalisieren.

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die QTL-Analyse nimmt, ist die Gestalt der untersuchten Population. Bei Tiermodellen kann zwischen Inzuchtpopulationen, ungerichtet gezüchteten Populationen, Backcross-Populationen und anderen unterschieden werden (Moore und Nagle, 2000; Coppieters et al., 1999; Lander und Schork, 1994). Jeder Populationstyp zeigt einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund, der in statistischen Analysen berücksichtigt werden müssen. Die Populations- und Familiengröße, d.h. Anzahl der Individuen und Geschwisterpaare, sowie die Anzahl der betrachteten Generationen wirken sich unmittelbar auf die Anzahl der zu beobachtenden Rekombinationsereignisse auf. Finden keine oder nur wenige Rekombinationen zwischen Chromosomenregionen statt, kann auch keine Kopplung zwischen Geno- und Phänotyp beobachtet werden (Coppieters et al., 1999), da der erreichbare Grad der Kartierung eines QTL von den Intervallen bestimmt wird, die von Rekombinationsereignissen flankiert werden (Boehnke, 1994).

Die Definition der Erkrankung bzw. des Krankheitsbildes sollte bei der Auswahl der Parameter möglichst eng gefasst sein (Lander und Schork, 1994). Das Ergebnis einer Kopplungs-Analyse hängt unmittelbar von den Parametern ab. Nur Merkmale, die deutliche Bestandteile des Krankheitsbildes sind und auf eindeutig messbaren Parametern basieren, lassen Aussagen über eine mögliche Kopplung mit einem Genotyp zu. Parasitäre Erkrankungen zeigen abgesehen von der im Wirt auftretenden Parasitämie viele unspezifische Symptome wie Fieber, Anämie, Gewichtsverlust und Müdigkeit. Anämie und Gewichtsverlust sind zwei Parameter, die auch in die hier vorliegenden QTL-Analyse eingegangen sind. Viele Parameter sind veränderliche Größen, die von kombinierten und/oder individuellen Ursachen beeinflusst werden. Deshalb ist der Phänotyp für Trypanotoleranz oder andere parasitäre Erkrankungen durch messbare Werte nur schwer vollständig zu beschreiben. Mit der von Hanotte et al (unpubliziert) vorgeschlagenen Aufteilung des Phänotyps Trypanotoleranz in 16 verschiedene, den Krankheitsverlauf berücksichtigende Parameter wurde bereits versucht, das Krankheitsbild möglichst umfassend zu beschreiben. Trotz erhöhter Markerzahl zur Genotypbestimmung der Tiere der untersuchten Rinderpopulation zeigten die Phänotypen

einzelnen genommen keine Kopplung zu den Genotypen. Eine QTL-Analyse aus kombinierten Phänotypen könnte, zusammen mit der erhöhten Markerzahl, möglicherweise zu einer erfolgreichen Identifikation einer QTL-Region führen.

Die neu lokalisierten Gene und anonymen Marker auf Chromosom *BTA5* stehen für weitere genetische Untersuchungen beim Rind zur Verfügung. Mit ihrer Hilfe wurden größere Abstände zwischen Markern auf dem Chromosom überbrückt. Die Bestimmung der Lage und Chromosomenzugehörigkeit der Gene ist neben der Identifikation der neuen konservierten syntänischen Gruppe zwischen Rind und Maus ein wichtiger Beitrag zur Genomkartierung beim Rind.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes zur Identifizierung von Genen und genetischen Markern, die bei afrikanischen Rindern mit quantitativen Merkmalen der relativen Resistenz gegen die Nagana-Krankheit (Trypanotoleranz) gekoppelt sind (*quantitative trait locus*-, QTL-Analyse). Die erste QTL-Analyse wurde von Mitarbeitern des ILRI (International Livestock Research Institutes, Nairobi) an einer Kreuzung trypanotoleranter und suszeptibler Tiere durchgeführt. Sie ergab Hinweise auf Kopplung mit relativ großen Regionen auf den Chromosomen 2, 5, und 7 (*BTA2*, *BTA5* bzw. *BTA7*). In einem internationalen Konsortium wurde unserer Arbeitsgruppe die weitere Bearbeitung des QTL auf *BTA5* übertragen, der zytogenetisch den Bereich *BTA5q21-24* einschloss.

Um die durchgeführte Analyse abzusichern und gegebenenfalls den QTL enger einzugrenzen, wurde die Markerdichte in der QTL-Region auf *BTA5* erhöht. Mit Hilfe einer chromosomensegmentspezifischen Bibliothek, die speziell für die Region *BTA5q21-24* hergestellt wurde, wurden 15 anonyme (Typ-II-) Marker identifiziert, 14 davon sequenzmarkierende Stellen (*sequence tagged sites*, STS-Marker) und 1 Mikrosatellit (*short tandem repeat*, STR-Marker). Darüber hinaus wurden durch vergleichende Genomanalyse bei Mensch, Maus und Rind 13 Gene auf *BTA5* kartiert. Mit Hilfe boviner Radiation-Hybridzelllinien (BovRH5000- und BovRH12000-*panel*) wurden diese 13 Gene, sowie 11 bereits früher auf *BTA5* lokalisierte Gene und die anonymen Marker auf *BTA5* angeordnet und stehen für weitere genetische Untersuchungen beim Rind zur Verfügung.

Eine bisher unbekannte syntänische Gruppe, die durch die zwei Gene VDR und PTPRB definiert ist, wurde zwischen *BTA5* und *MMU5* der Maus konserviert gefunden. Neben Umordnungen in der Reihenfolge von Genen, die beim Rind im Vergleich zum Menschen festgestellt wurden, ist diese konservierte syntänische Gruppe ein wichtiger Beitrag zur Genomkartierung beim Rind. Für die Analyse der bovinen Trypanotoleranz ist sie von Interesse, da die beiden Gene bei der Maus in direkter Nachbarschaft des früher identifizierten Trypanotoleranz-QTL „*Tir2*“ auf *MMU5* liegen.

Durch Sequenzanalysen der Typ-I- und der neuen Typ-II-Marker bei den Tieren der ILRI-Kreuzung wurden in 6 von 24 auf *BTA5* kartierten Genen informative Polymorphismen identifiziert. Mit diesen zusätzlichen Markern wurde die Kopplungsanalyse mit Merkmalen der Trypanotoleranz in der ILRI-Rinderpopulation wiederholt. Der zuvor erhobene Befund der Kopplung auf *BTA5* wurde nicht bestätigt.

Summary

This study is part of a project to identify genes involved and genetic marker linked to the ability of african cattle to tolerate Nagana sickness (trypanotolerance) caused by trypanosomes.

A QTL-analysis, done by ILRI (International Livestock Research Institute) collaborators, indicates linkage to three large regions on chromosome *BTA2*, *BTA5* and *BTA7* in a crossbreed cattle population of trypanotolerant and susceptible animals. Further work on *BTA5* was applied to our group.

In order to confirm and to narrow down the trypanotolerance QTL on *BTA5*, which was mapped to *BTA5* q21-24, it was essential to increase the marker density on the chromosome. 15 type-II-marker, 14 sequence tagged sites (STS) and one microsatellite (STR) have been identified and characterized from a microdissected segmentspecific library. In addition, 24 candidate genes, 13 of them previously unmapped in the bovine genome, have been characterized by comparative mapping and sequence analysis.

The 13 unmapped candidate genes were mapped on *BTA5* using a bovine somatic hybrid panel. Using the bovine radiation hybrid panels (BovRH5000 and BovRH12000), all the new defined marker were ordered on *BTA5*. This is a substantial input for further bovine genome studies.

On the basis of the new RH-map of *BTA5*, we could demonstrate rearrangements in the gene order between cattle and human. Furthermore, a previously unknown syntenic group of two genes (VDR and PTPRB) was found to be conserved between *BTA5* and *MMU5* in mice. Interestingly, in mice, these two genes are adjacent to a chromosomal region, which was identified as a trypanotolerance QTL “*Tir2*” on *MMU5*.

Sequence analysis, in all type-I-and in the new defined type-II-marker, revealed six informative SNPs, which were used for further linkage analysis for trypanotolerance in the ILRI cattle crossbreed. The previously identified trypanotolerance QTL on *BTA5* could not be confirmed.

6 Literatur

- Abbott C, Povey S: Development of human chromosome-specific PCR primers for characterization of somatic cell hybrids. *Genomics*. 1991 Jan;9(1):73-7.
- Aleyasin A, Barendse W: Comparative mapping of genes from human chromosome 12 by genetic linkage mapping in cattle. *J Hered*. 1999 Sep-Oct;90(5):537-42.
- Ali M, deCastro JJ: Host resistance to ticks (Acari: Ixodidae) in different breeds of cattle to Bako, Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 28,29S-37S, 1993.
- Allsopp R: Options for vector control against trypanosomiasis in Africa. *Trends Parasitol.* 2001 Jan;17(1):15-9.
- al-Majali KM, Glazier AM, Norsworthy PJ, Wahid FN, Cooper LD, Wallace CA, Scott J, Lausen B, Aitman TJ: A high-resolution radiation hybrid map of the proximal region of rat chromosome 4. *Mamm Genome*. 1999 May;10(5):471-6.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- Amarante MR, Yang YP, Kata SR, Lopes CR, Womack JE: RH maps of bovine chromosomes 15 and 29: conservation of human chromosomes 11 and 5. *Mamm Genome*. 2000 May;11(5):364-8.
- Ambady S, Kappes SM, Park C, Ma RZ, Beever JE, Lewin HA, Smith TP, Beattie CW, Basrur PK, Ponce de Leon FA: Development and mapping of microsatellites from a microdissected BTA 11-specific DNA library. *Anim Genet.* 2001 Jun;32(3):152-5.
- Andersson L, Haley CS, Ellegren H, Knott SA, Johansson M, Andersson K, Andersson-Eklund L, Edfors-Lilja I, Fredholm M, Hansson I, et al.: Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*. 1994 Mar 25;263(5154):1771-4.
- Andersson L, Archibald A, Ashburner M, Audun S, Barendse W, Bitgood J, Bottema C, Broad T, Brown S, Burt D, Charlier C, Copeland N, Davis S, Davisson M, Edwards J, Eggen A, Elgar G, Eppig JT, Franklin I, Grewe P, Gill T 3rd, Graves JA, Hawken R, Hetzel J, Womack J, et al.: Comparative genome organization of vertebrates. The First International Workshop on Comparative Genome Organization. *Mamm Genome*. 1996 Oct;7(10):717-34.
- Anene BM, Onah DN, Nawa Y: Drug resistance in pathogenic African trypanosomes: what hopes for the future? *Vet Parasitol.* 2001 Mar 20;96(2):83-100.
- Ashcroft MT, Burt E, Fairbairn H: The experimental infection of some African wild animals with *Trypanosoma rhodesiense*, *T. brucei* and *T. congolense*. *Annals of Tropical medicine and Parasitology* 1959. 53,147-61
- Ashcroft MT: An attempt to isolate *T. rhodesiense* from wild animals. *Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene* 1958. 52,276-82
- Ashcroft MT: The importance of African wild animals as reservoirs of trypanosomiasis. *East African Medical Journal* 1959. 36,289-97.

- Baker JR: Trypanosomes of wild mammals in the neighborhood of the Serengeti National Park, Tanzania. *Tropenmedizin und Parasitologie* 1968. 18,280-4.
- Band M, Larson JH, Womack JE, Lewin HA: A radiation hybrid map of BTA23: identification of a chromosomal rearrangement leading to separation of the cattle MHC class II subregions. *Genomics*. 1998 Nov 1;53(3):269-75.
- Band MR, Larson JH, Rebeiz M, Green CA, Heyen DW, Donovan J, Windish R, Steining C, Mahyuddin P, Womack JE, Lewin HA: An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Res*. 2000 Sep;10(9):1359-68.
- Barendse W, Armitage SM, Aleyasin A, Womack JE: Differences between the radiation hybrid and genetic linkage maps of bovine chromosome 5 resolved with a quasi-phylogenetic method of analysis. *Mamm Genome*. 2000 May;11(5):369-72.
- Barendse W, Vaiman D, Kemp SJ, Sugimoto Y, Armitage SM, Williams JL, Sun HS, Eggen A, Agaba M, Aleyasin SA, Band M, Bishop MD, Buitkamp J, Byrne K, Collins F, Cooper L, Coppettiers W, Denys B, Drinkwater RD, Easterday K, Elduque C, Ennis S, Erhardt G, Li L, et al.: A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mamm Genome*. 1997 Jan;8(1):21-8.
- Barry JD, Vickerman K: Trypanosoma brucei: loss of variable antigens during transformation from bloodstream to procyclic forms in vitro. *Exp Parasitol*. 1979 Oct;48(2):313-24.
- Baumung R: Grundsätze der Genomanalyse. Zentrale Arbeitsgemeinschaft österreichischer Rinderzüchter. 2001:3-8.
- Beck G, Götz KU, Thaller G: Zuchtentscheid im Labor: Markergestützte Selektion beim Rind. *Fleckvieh* 2000. 4: 16-7.
- Beckmann JS, Soller M: Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. *Theor. Appl. Genet*. 1988. 76: 228-236.
- Behrens F, Claussen U, Iyer LM, Green ED, Horsthemke B, Williamson R, Huxley C, Coutelle C: Isolation of DNA from the centromere of human chromosome 7 by microdissection. *Chromosome Res*. 1997 Jun;5(4):215-20.
- Binder GK, Griffin DE: Interferon-gamma-mediated site-specific clearance of alphavirus from CNS neurons. *Science*. 2001 Jul 13;293(5528):303-6.
- Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL, Hawkins GA, Toldo SS, Fries R, Grosz MD, Yoo J, et al.: A genetic linkage map for cattle. *Genetics*. 1994 Feb;136(2):619-39.
- Black SJ, Seed JR, Murphy NB: Innate and acquired resistance to African trypanosomiasis. *J Parasitol*. 2001 Feb;87(1):1-9.
- Blaschke RJ, Rappold GA: Man to mouse--lessons learned from the distal end of the human X chromosome. *Genome Res*. 1997 Dec;7(12):1114-7.
- Boehnke M: Limits of resolution of genetic linkage studies: implications for the positional cloning of human disease genes. *Am J Hum Genet*. 1994 Aug;55(2):379-90.

- Boehnke M, Lange K, Cox DR: Statistical methods for multipoint radiation hybrid mapping. *Am J Hum Genet.* 1991 Dec;49(6):1174-88.
- Boucheix C, Benoit P, Frachet P, Billard M, Worthington R E, Gagnon J, Uzan G: Molecular cloning of the CD9 antigen: a new family of cell surface proteins. *J. Biol. Chem.* 1991. 266: 117-122.
- Bovenhuis H: Marker assisted selection in dairy cattle breeding schemes. In: 2. Rinderworkshop Uelzen: 'Auswirkungen neuer Technologien auf die Rinderzucht', Uelzen, 1999.63-71
- Bovenhuis H, van Arendonk JAM, Davis G, Elsen JM, Haley CS, Hill WG, Baret PV, Hetzel DJS, Nicholas FW: Detection and mapping of quantitative trait loci in farm animals. *Liv. Prod. Sci.* 1997 (52):135-144.
- Brouillette JA, Andrew JR, Venta PJ: Estimate of nucleotide diversity in dogs with a pool-and-sequence method. *Mamm Genome.* 2000 Dec;11(12):1079-86.
- Bush GL, Case SM, Wilson AC, Patton JL: Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Sep;74(9):3942-6.
- Camara VM, Harding JW, Prieur DJ: Inherited lysozyme deficiency in rabbits. The absence of a primary isozyme of lysozyme as the cause of the condition. *Lab Invest.* 1990 Oct;63(4):544-50.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES: Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.* 1999 Jul;22(3):231-8.
- Carver EA, Stubbs L: Zooming in on the human-mouse comparative map: genome conservation re-examined on a high-resolution scale. *Genome Res.* 1997 Dec;7(12):1123-37.
- Catani L, Amabile M, Luatti S, Valdre L, Vianelli N, Martinelli G, Tura S: Interleukin-4 downregulates nuclear factor-erythroid 2 (nf-e2) expression in primary megakaryocytes and in megakaryoblastic cell lines. *Stem Cells.* 2001;19(4):339-47.
- Chandler RL: Comparative tolerance of N'Dama cattle to trypanosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 1952. 46,127-34.
- Chaudhary R, Kijas J, Raudsepp T, Guan XY, Zhang H, Chowdhary BP: Microdissection of pig chromosomes: dissection of whole chromosomes, arms and bands for construction of paints and libraries. *Hereditas.* 1998;128(3):265-71.
- Chen H, Leipprandt JR, Traviss CE, Sopher BL, Jones MZ, Cavanagh KT, Friderici KH: Molecular cloning and characterization of bovine beta-mannosidase. *J Biol Chem.* 1995 Feb 24;270(8):3841-8.
- Chowdhary BP, Fronicke L, Gustavsson I, Scherthan H: Comparative analysis of the cattle and human genomes: detection of ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. *Mamm Genome.* 1996 Apr;7(4):297-302.

- Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L: New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science*. 1998 Oct 23;282(5389):682-9.
- Copeland NG, Jenkins NA, Gilbert DJ, Eppig JT, Maltais LJ, Miller JC, Dietrich WF, Weaver A, Lincoln SE, Steen RG, et al.: A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects. *Science*. 1993 Oct 1;262(5130):57-66.
- Coppieters W, Riquet J, Arranz JJ, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, Karim L, Marcq F, Moreau L, Nezer C, Simon P, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Georges M: A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. *Mamm Genome*. 1998 Jul;9(7):540-4.
- Coppieters W, Blott S, Farnier F, Grisart B, Riquet J, Georges M: From Phenotype to Genotype: Towards Positional Cloning of Quantitative Trait Loci in Livestock? In: *From Jay Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics*. Edited by Jack C.M. Dekkers, Susan J. Lamont and Max F. Rothschild, Iowa State University, 1999.
- Cox DR, Burmeister M, Price ER, Kim S, Myers RM: Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science*. 1990 Oct 12;250(4978):245-50.
- Danielson KG, Fazio A, Cohen I, Cannizzaro LA, Eichstetter I, Iozzo RV: The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5' untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics*. 1993 Jan;15(1):146-60.
- Dargie JD, Murray PK, Murray M, Grimshaw WR, McIntyre WI: Bovine trypanosomiasis: the red cell kinetics of Ndama and Zebu cattle infected with *Trypanosoma congolense*. *Parasitology*. 1979 Jun;78(3):271-86.
- Darvasi A: Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat Genet*. 1998 Jan;18(1):19-24.
- Darvasi A, Soller M: Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. *Genetics*. 1995 Nov;141(3):1199-207.
- Darvasi A, Soller M: Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. *Theor. Appl. Genet*. 1992. 85: 353-359.
- Darvasi A, Soller M: A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav Genet*. 1997 Mar;27(2):125-32.
- Dayhoff MO: *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Lactalbumin and Lysozymes. Washington: National Biomedical Research Foundation (pub.) 5 1972. Pp. D133-D140.
- Dennis JA, Healy PJ, Beaudet AL, O'Brien WE: Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(20):7947-51.
- Dentine MR: Marker-assisted selection. In: *The Genetics of Cattle* / edited by R. Fries and A. Ruvinsky. CABI Publishing, 1999.

- Dey BR, Spence SL, Nissley P, Furlanetto RW: Interaction of human suppressor of cytokine signaling (SOCS)-2 with the insulin-like growth factor-I receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 24095-24101, 1998.
- Dickman S: Gene mutation provides more meat on the hoof. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):1922-3.
- d'Ieteren GD, Authie E, Wissocq N, Murray M: Trypanotolerance, an option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomiasis. *Rev Sci Tech.* 1998 Apr;17(1):154-75. Review
- Dietrich WF, Radany EH, Smith JS, Bishop JM, Hanahan D, Lander ES: Genome-wide search for loss of heterozygosity in transgenic mouse tumors reveals candidate tumor suppressor genes on chromosomes 9 and 16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 27;91(20):9451-5.
- Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM, et al.: Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature.* 1991 Jul 25;352(6333):337-9.
- Dillmann JS, Townsend AJ: A trypanosomiasis survey of wild animals in the Luangwa Valley, Zambia. *Acta Trop.* 1979 Dec;36(4):349-56.
- Drager N, Mehrlitz D: Investigations on the prevalence of trypanosome carriers and the antibody response in wildlife in Northern Botswana. *Tropenmedizin und Parasitologie* 1978. 29,223-33.
- Dryja TP, McGee TL, Hahn LB, Cowley GS, Olsson JE, Reichel E, Sandberg MA, Berson EL: Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med.* 1990 Nov 8;323(19):1302-7.
- Dwinger RH, Grootenhuis JG, Murray M, Moloo SK, Gettinby G: Susceptibility of buffaloes, cattle and goats to infection with different stocks of *Trypanosoma vivax* transmitted by *Glossina morsitans centralis*. *Res Vet Sci.* 1986 Nov;41(3):307-15.
- Echard G, Broad TE, Hill D, Pearce P Present status of the ovine gene map (*Ovis aries*); comparison with the bovine map (*Bos taurus*). *Mamm Genome.* 1994 Jun;5(6):324-32. Review.
- Eggen A, Fries R: An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Anim Genet.* 1995 Aug;26(4):215-36.
- Eppig JT: Comparative maps: adding pieces to the mammalian jigsaw puzzle. *Curr Opin Genet Dev.* 1996 Dec;6(6):723-30. Review.
- Eppig JT, Nadeau JH: Comparative maps: the mammalian jigsaw puzzle. *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Dec;5(6):709-16. Review.
- Epstein H: The origin of the domestic animals of Africa. African Publishing Corporation, New York. 1971
- Erle DJ, Sheppard D, Breuss J, Ruegg C, Pytela R: Novel integrin alpha and beta subunit cDNAs identified in airway epithelial cells and lung leukocytes using the polymerase chain reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991 Aug;5(2):170-7.

- Ferretti L, Urquhart BG, Eggen A, Olsaker I, Harlizius B, Castiglioni B, Mezzelani A, Solinas Toldo S, Thieven U, Zhang Y, Morgan AL, Teres VM, Schwerin M, Martin-Burriel I, Chowdhary BP, Erhardt G, Nijman IJ, Cribiu EP, Barendse W, Leveziel H, Fries R, Williams JL: Cosmid-derived markers anchoring the bovine genetic map to the physical map. *Mamm Genome*. 1997 Jan;8(1):29-36.
- Ferriman A: Fake cows help to reduce sleeping sickness and use of insecticides. *BMJ*. 2001 Sep 29;323(7315):711A.
- Fevre E: More thoughts on the control of trypanosomes in cattle. *Trends Parasitol*. 2001 Sep;17(9):412-3.
- Fleming MD, Andrews NC: Mammalian iron transport: an unexpected link between metal homeostasis and host defense. *J Lab Clin Med*. 1998 Dec;132(6):464-8.
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC: Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 3;95(3):1148-53.
- Gastellu Etchegorry M, Helenport JP, Pecoul B, Jannin J, Legros D: Availability and affordability of treatment for Human African Trypanosomiasis. *Tropical Medicine and International Health* 2001 Nov;6(11):957-9.
- Gearheart WW, Smith C, Teepker G: Multiple ovulation and embryo manipulation in the improvement of beef cattle: relative theoretical rates of genetic change. *J Anim Sci*. 1989 Nov;67(11):2863-71.
- Geigy R, Mwambu PM, Kauffmann M: Sleeping sickness survey in Musoma district, Tanzania. IV. Examination of wild mammals as a potential reservoir for *T. rhodesiense*. *Acta Trop*. 1971;28(3):211-20.
- Georges M, Massey JM: Velogenetics, or the synergistic use of marker-assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenology* 1991;35, 151-159
- Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, et al.: Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*. 1995 Feb;139(2):907-20.
- Gerhard DS, Dobner PR, Bruns GAP: Localization of the neurotensin gene to human chromosome 12. *Cytogenet. Cell Genet*. 1989. 51: 1003 only.
- Goldammer T, Brunner RM, Schmidt P, Schwerin M: Mapping of the interferon gamma gene (IFNG) to chromosomes 3 in sheep and 5 in goat by FISH. *Mamm Genome*. 1996 Jun;7(6):470-1.
- Goldammer T, Brunner RM, Kang'a S, Hanotte O, Schwerin M: Establishment of bovine chromosome region specific high resolution maps using microdissection. *Anim Biotechnol*. 1999;10(3):113-8.
- Graves JA: Mammals that break the rules: genetics of marsupials and monotremes. *Annu Rev Genet*. 1996;30:233-60.

- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M: A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nat Genet.* 1997 Sep;17(1):71-4.
- Grootenhuys JG, Dwinger RH, Dolan RB, Moloo SK, Murray M: Susceptibility of African buffalo and Boran cattle to *Trypanosoma congolense* transmitted by *Glossina morsitans centralis*. *Vet Parasitol.* 1990 Mar;35(3):219-31.
- Gu Z, Womack JE, Kirkpatrick BW: A radiation hybrid map of bovine Chromosome 7 and comparative mapping with human Chromosome 19 p arm. *Mamm Genome.* 1999 Nov;10(11):1112-4.
- Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal H, Svanborg C: Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1995. 92:8064-8.
- Hall L, Emery DC, Davies MS, Parker D, Craig RK: Organization and sequence of the human alpha-lactalbumin gene. *Biochem. J.* 1987. 242:735-42.
- Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A: Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet.* 1999 Jul;22(3):239-47.
- Hayes HC, Popescu P, Dutrillaux B: Comparative gene mapping of lactoperoxidase, retinoblastoma, and alpha-lactalbumin genes in cattle, sheep, and goats. *Mamm Genome.* 1993;4(10):593-7.
- Hills D, Tracey S, Masabanda J, Fries R, Schalkwyk LC, Lehrach H, Miller JR, Williams JL: A bovine YAC library containing four- to five-fold genome equivalents. *Mamm Genome.* 1999 Aug;10(8):837-8.
- Hukriede NA, Joly L, Tsang M, Miles J, Tellis P, Epstein JA, Barbazuk WB, Li FN, Paw B, Postlethwait JH, Hudson TJ, Zon LI, McPherson JD, Chevrette M, Dawid IB, Johnson SL, Ekker M: Radiation hybrid mapping of the zebrafish genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 17;96(17):9745-50.
- ILCA/ILRAD-Report; Ethiopien, 1986
- ILCA/ILRAD-Report; Kenia, 1986
- ILCA-Report, 1979
- ILRAD, Annual Report 1991
- Inaba M, Yawata A, Koshino I, Sato K, Takeuchi M, Takakuwa Y, Manno S, Yawata Y, Kanzaki A, Sakai J, Ban A, Ono K, Maede Y: Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation. *J Clin Invest.* 1996 Apr 15;97(8):1804-17.
- Iraqi F: Fine mapping of quantitative trait loci using advanced intercross lines of mice and positional cloning of the corresponding genes. *Exp Lung Res.* 2000 Dec;26(8):641-9.

- Iraqi F, Clapcott SJ, Kumari P, Haley CS, Kemp SJ, Teale AJ: Fine mapping of trypanosomiasis resistance loci in murine advanced intercross lines. *Mamm Genome*. 2000 Aug;11(8):645-8.
- Iraqi F, Sekikawa K, Rowlands J, Teale A: Susceptibility of tumour necrosis factor-alpha genetically deficient mice to *Trypanosoma congolense* infection. *Parasite Immunol*. 2001 Aug;23(8):445-51.
- Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC: Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc. Roy. Soc. London* 147B: 268-273, 1957.
- Janel N, Schibler L, Oustry A, Kerbirou-Nabias D, Crihiu EP, Vaiman D: The localization of the von Willebrand factor gene on cattle, sheep and goat chromosomes illustrates karyotype evolution in mammals. *Mamm Genome*. 1996 Aug;7(8):633-4.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 1985 Mar 7-13;314(6006):67-73.
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP: Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*. 1995 Jul 27;376(6538):313-20.
- Joerg H, Fries HR, Meijerink E, Stranzinger GF: Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mamm Genome*. 1996 Apr;7(4):317-8.
- Joja LL, Okoli UA: Trapping the vector: Community Action Curb Sleeping Sickness in Southern Sudan. *Am J Public Health*. 2001 Oct;91(10):1583-5.
- Kao FT, Tong S, Whittier A, Yu J: Complete set of eleven region-specific microdissection libraries for human chromosome 2. *Somat Cell Mol Genet*. 1996 Jan;22(1):57-66.
- Kehrli ME Jr, Schmalstieg FC, Anderson DC, Van der Maaten MJ, Hughes BJ, Ackermann MR, Wilhelmsen CL, Brown GB, Stevens MG, Whetstone CA: Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome: identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein. *Am J Vet Res*. 1990 Nov;51(11):1826-36.
- Keiser J, Stich A, Burri C: New drugs for the treatment of human African trypanosomiasis: research and development. *Trends Parasitol*. 2001 Jan;17(1):42-9.
- Kemp SJ, Teal AJ: Bovine Genome Mapping and Trypanotolerance. The International Laboratory on Animal Diseases. Ed. by Teale AJ., 1991.
- Kemp SJ., Teale AJ: Genetic Basis of Trypanotolerance in Cattle and Mice. *Parasitol Today*. 1998 14(11):450-4.
- Kemp SJ, Darvasi A, Soller M, Teale AJ: Genetic control of resistance to trypanosomiasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996 Nov;54(1-4):239-43.
- Kemp SJ, Iraqi F, Darvasi A, Soller M, Teale AJ: Localization of genes controlling resistance to trypanosomiasis in mice. *Nat Genet*. 1997 Jun;16(2):194-6.

- Kennedy D: Embryo Transfer in African Cattle. Trypanotolerant Livestock Newsletter No.5. 1992:9-11.
- Kinghorn B: Positional cloning, candidate genes, synteny/comparative mapping. In Kursskript: Identifying and incorporating genetic markers and major genes in animal breeding programs. 2000.
- Kirkpatrick BW, Bradshaw M, Barendse W, Dentine MR: Development of bovine microsatellite markers from a microsatellite-enriched library. *Mamm Genome*. 1995 Aug;6(8):526-8.
- Knippers : Molekulare Genetik. Thieme Verlag, 8. Auflage. 2001
- Kwok PY, Deng Q, Zakeri H, Taylor SL, Nickerson DA: Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs. *Genomics*. 1996 Jan 1;31(1):123-6.
- Lahbib-Mansais Y, Leroux S, Milan D, Yerle M, Robic A, Jiang Z, Andre C, Gellin J: Comparative mapping between humans and pigs: localization of 58 anchorage markers (TOASTs) by use of porcine somatic cell and radiation hybrid panels. *Mamm Genome*. 2000 Dec;11(12):1098-106.
- Lander ES, Schork NJ: Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994 Sep 30;265(5181):2037-48.
- Lange K, Boehnke M, Cox DR, Lunetta KL: Statistical methods for polyploid radiation hybrid mapping. *Genome Res*. 1995 Sep;5(2):136-50.
- Leakey R and Lewin R: Origins. Rainbird Publishing. 1977
- Letenneur L: Crossbreeding N'Dama and Jersey cattle in Ivory Coast. *World Animal Review* 1978. 27,36-42
- Leygues M, Gouteux JP: [A community battle against a tropical endemic disease: supernatural beliefs and tsetse fly traps in the Congo]. *Soc Sci Med*. 1989;28(12):1255-67.
- Li WH, Gouy M, Sharp PM, O'hUigin C, Yang YW: Molecular phylogeny of Rodentia, Lagomorpha, Primates, Artiodactyla, and Carnivora and molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Sep;87(17):6703-7.
- Li XY, Mattei MG, Zaleska-Rutczynska Z, Hooft van Huijsduijnen R, Figueroa F, Nadeau J, Benoist C, Mathis D: One subunit of the transcription factor NF-Y maps close to the major histocompatibility complex in murine and human chromosomes. *Genomics*. 1991 Nov;11(3):630-4.
- Lien S, Karlsen A, Klemetsdal G, Vage DI, Olsaker I, Klungland H, Aasland M, Heringstad B, Ruane J, Gomez-Raya L: A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting twinning rate. *Mamm Genome*. 2000 Oct;11(10):877-82.
- Lincoln S, Daly M, Lander ES: Mapping genes controlling quantitative traits with MAPMAKER/QTL 1.1 Whitehead Institute Technical Report, 2nd ed. 1992.

- Lindgren G, Breen M, Godard S, Bowling A, Murray J, Scavone M, Skow L, Sandberg K, Guerin G, Binns M, Ellegren H: Mapping of 13 horse genes by fluorescence in-situ hybridization (FISH) and somatic cell hybrid analysis. *Chromosome Res.* 2001;9(1):53-9.
- Losos GJ, Chouinard A: Pathogenicity of Trypanosomes. Ottawa: IDRC Press. 1979.
- Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B: Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature.* 1989 Mar 23;338(6213):348-50.
- Lunetta KL, Boehnke M, Lange K, Cox DR.: Selected locus and multiple panel models for radiation hybrid mapping. *Am J Hum Genet.* 1996 Sep;59(3):717-25.
- Lyons LA, Laughlin TF, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, O'Brien SJ: Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nat Genet.* 1997 Jan;15(1):47-56.
- Mai JK, Triepel J, Metz J: Neurotensin in human brain. *Neuroscience* 22: 499-524, 1987.
- Malek M, Dekkers JC, Lee HK, Baas TJ, Prusa K, Huff-Lonergan E, Rothschild MF: A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mamm Genome.* 2001 Aug;12(8):637-45.
- Mann M, Latham KE, Varmuza S: Identification of genes showing altered expression in preimplantation and early postimplantation parthenogenetic embryos. *Dev Genet.* 1995;17(3):223-32.
- Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, et al.: Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell.* 1990 Oct 5;63(1):203-11.
- Mattioli RC, Jean O, Belem AM: [Incidence of trypanosomiasis on wildlife of a game ranch in Burkina Faso]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop.* 1990;43(4):459-65.
- McDermott JJ, Coleman PG: Comparing apples and oranges--model-based assessment of different tsetse-transmitted trypanosomosis control strategies. *Int J Parasitol.* 2001 May 1;31(5-6):603-9. Review
- Medrano JF: Errata. Genotyping of bovine kappa-casein following DNA sequence amplification. *Biotechnology (N Y).* 1990 Aug;8(8):768.
- Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Hartley L, Alexander WS: The development of fatal myocarditis and polymyositis in mice heterozygous for IFN-gamma and lacking the SOCS-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 1;97(16):9174-9.
- Moore KJ, Nagle DL: Complex trait analysis in the mouse: The strengths, the limitations and the promise yet to come. *Annu Rev Genet.* 2000;34:653-686.
- Moore SS, Byrne K, Berger KT, Barendse W, McCarthy F, Womack JE, Hetzel DJ: Characterization of 65 bovine microsatellites. *Mamm Genome.* 1994 Feb;5(2):84-90.

- Morrison WI, Roelants GE, Mayor-Withey KS, Murray M: Susceptibility of inbred strains of mice to *Trypanosoma congolense*: correlation with changes in spleen lymphocyte populations. *Clin Exp Immunol.* 1978 Apr;32(1):25-40.
- Mulla AF, Rickman LR: Evidence for the presence of an innate trypanosomicidal factor in the serum of a non-immune African waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus*). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(1):97-8.
- Murray M, Dexter TM: Anaemia in bovine African trypanosomiasis. A review. *Acta Trop.* 1988 Dec;45(4):389-432.
- Murray M, Morrison WI, Whitelaw DD: Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. *Adv Parasitol.* 1982;21:1-68. Review.
- Murray M, Trail JC, D'Ieteren GD: Trypanotolerance in cattle and prospects for the control of trypanosomiasis by selective breeding. *Rev Sci Tech.* 1990 Jun;9(2):369-86. Review.
- Murray M, Black SJ: African Trypanosomiasis in cattle: working with nature's solution. *Vet. Parasitol.* 1985;18:167-182.
- Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N: IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature.* 1999 Aug 5;400(6744):581-5.
- Nadeau JH: Maps of linkage and synteny homologies between mouse and man. *Trends Genet.* 1989 Mar;5(3):82-6. Review.
- Nicholas, FW: *Introduction to Veterinary Genetics.* Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1996. 19-21, 34, 69-71, 254, 270
- Nilsen H, Rosewell I, Robins P, Skjelbred CF, Andersen S, Slupphaug G, Daly G, Krokan HE, Lindahl T, Barnes DE: Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication. *Mol Cell.* 2000 Jun;5(6):1059-65.
- Norman SA, Mott DM: Molecular cloning and chromosomal localization of a human skeletal muscle PP-1-gamma-1 cDNA. *Mammalian Genome* 1994. 5: 41-45.
- Nyeko JHP, Ole-Moiyoi OK, Majiwa PAO, Otieno LH, Ociba PM: Characterization of trypanosome isolates from cattle in Uganda using species-specific DNA probes reveals predominance of mixed infections. *Insect Sci. Applic.* 1990.11:271-80.
- O'Brien SJ, Seuanez HN, Womack JE: Mammalian genome organization: an evolutionary view. *Annu Rev Genet.* 1988;22:323-51.
- O'Brien SJ, Womack JE, Lyons LA, Moore KJ, Jenkins NA, Copeland NG: Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nat Genet.* 1993 Feb;3(2):103-12.
- O'Brien SJ, Cevario SJ, Martenson JS, Thompson MA, Nash WG, Chang E, Graves JA, Spencer JA, Cho KW, Tsujimoto H, Lyons LA: Comparative gene mapping in the domestic cat (*Felis catus*). *J Hered.* 1997 Sep-Oct;88(5):408-14.

- Olubayo RO, Grootenhuis JG, Rurangirwa FR: Susceptibility of African buffalo and Boran cattle to intravenous inoculation with *Trypanosoma congolense* bloodstream forms. *Trop Med Parasitol.* 1990 Jun;41(2):181-4.
- Ozawa A, Band MR, Larson JH, Donovan J, Green CA, Womack JE, Lewin HA: Comparative organization of cattle chromosome 5 revealed by comparative mapping by annotation and sequence similarity and radiation hybrid mapping. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 11;97(8):4150-5.
- Pletcher MT, Roe BA, Chen F, Do T, Do A, Malaj E, Reeves RH: Chromosome evolution: the junction of mammalian chromosomes in the formation of mouse chromosome 10. *Genome Res.* 2000 Oct;10(10):1463-7.
- Primrose SB: *Genomanalyse.* Spektrum Akademischer Verlag.1996.
- Prussak CE, Almazan MT, Tseng BY: Mouse primase p49 subunit molecular cloning indicates conserved and divergent regions. *J Biol Chem.* 1989 Mar 25;264(9):4957-63.
- Putnam EA, Zhang H, Ramirez F, Milewicz DM: Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nat Genet.* 1995 Dec;11(4):456-8.
- Rebeiz M, Lewin HA: Compass of 47,787 cattle ESTs. *Anim Biotechnol.* 2000 Nov;11(2):75-241.
- Reduth D, Grootenhuis JG, Olubayo RO, Muranjan M, Otieno-Omondi FP, Morgan GA, Brun R, Williams DJ, Black SJ: African buffalo serum contains novel trypanocidal protein. *J Eukaryot Microbiol.* 1994 Mar-Apr;41(2):95-103.
- Rege JEO, Aboagye GS, Tawah CL: Shorthorn cattle of West and Central Africa I. Origin, distribution, classification and population statistics. *FAO Report,* 1999
- Rettenberger G, Fredholm M, Fries R: Chromosomal assignment of porcine microsatellites by use of a somatic cell hybrid mapping panel. *Anim Genet.* 1994 Oct;25(5):343-5.
- Rettenberger G, Klett C, Zechner U, Bruch J, Just W, Vogel W, Hameister H: ZOO-FISH analysis: cat and human karyotypes closely resemble the putative ancestral mammalian karyotype. *Chromosome Res.* 1995 Dec;3(8):479-86.
- Rexroad CE, Schlapfer JS, Yang Y, Harlizius B, Womack JE: A radiation hybrid map of bovine chromosome one. *Anim Genet.* 1999 Oct;30(5):325-32.
- Rexroad CE 3rd, Owens EK, Johnson JS, Womack JE: A 12,000 rad whole genome radiation hybrid panel for high resolution mapping in cattle: characterization of the centromeric end of chromosome 1. *Anim Genet.* 2000 Aug;31(4):262-5.
- Richardson KK, Crosby RM, Good PJ, Rosen NL, Mayfield JE: Bovine DNA contains a single major family of interspersed repetitive sequences. *Eur J Biochem.* 1986 Jan 15;154(2):349-54.
- Ricketts MH, Simons MJ, Parma J, Mercken L, Dong Q, Vassart G: A nonsense mutation causes hereditary goitre in the Afrikaner cattle and unmasks alternative splicing of thyroglobulin transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 May;84(10):3181-4.

- Roelants GE: Natural resistance to African trypanosomiasis. *Parasite Immunol.* 1986 Jan;8(1):1-10.
- Rubin MA: Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays, and tissue microarrays in advancing our understanding of prostate cancer. *J Pathol.* 2001 Sep;195(1):80-6. Review.
- Rurangirwa FR, Musoke AJ, Nantulya VM, Nkonge C, Njuguna L, Mushi EZ, Karstad L, Grootenhuis J: Immune effector mechanisms involved in the control of parasitaemia in *Trypanosoma brucei*-infected wildebeest (*Connochaetes taurinus*). *Immunology.* 1986 Jun;58(2):231-7.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.* 1992;24:104-8.
- Sazanov A, Benkel BF, Hickey DA, Kollers S, Fries R: The bovine AMP-activated protein kinase subunit gamma 1 gene (PRKAG1) maps to 5q21-q22. *Anim Genet.* 1999 Dec;30(6):473-4.
- Scholzen T, Solursh M, Suzuki S, Reiter R, Morgan JL, Buchberg AM, Siracusa LD, Iozzo RV: The murine decorin. Complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment, and expression during organogenesis and tissue differentiation. *J Biol Chem.* 1994 Nov 11;269(45):28270-81.
- Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tome P, Aggarwal A, Bajorek E, Bentolila S, Birren BB, Butler A, Castle AB, Chiannilkulchai N, Chu A, Clee C, Cowles S, Day PJ, Dibling T, Drouot N, Dunham I, Duprat S, East C, Hudson TJ, et al.: A gene map of the human genome. *Science.* 1996 Oct 25;274(5287):540-6.
- Schwenger B, Schober S, Simon D: DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. *Genomics.* 1993 Apr;16(1):241-4.
- Schwerin M, von Lengerken G, Fredholm M, Christensen K, Krause S: DNA polymorphisms in two transcription control elements (SP1- and TATA-box) of porcine HSP70.2 gene detected by allele-specific PCR. *Anim Genet.* 1995 Jun;26(3):203-4.
- Schwerin M: Genomanalyse in der Tierzucht. In: 14. Hülseberger Gespräche: 'Biologisch-Technische Entwicklung in der Tierproduktion', Lüneburg, 1992,154-164
- Schwerin M, Kühn C: Internationaler Stand der QTL-Kartierung beim Rind. In: 2. Rinderworkshop Uelzen: 'Auswirkungen neuer Technologien auf die Rinderzucht', Uelzen, 16.-17.02.1999, 42-50
- Semsarian C, Sutrave P, Richmond DR, Graham RM: Insulin-like growth factor (IGF-I) induces myotube hypertrophy associated with an increase in anaerobic glycolysis in a clonal skeletal-muscle cell model. *Biochem J.* 1999 Apr 15;339 (Pt 2):443-51.
- Shamsadin R, Jantsan K, Adham I, Engel W: Cloning, organisation, chromosomal localization and expression analysis of the mouse *Prkag1* gene. *Cytogenet Cell Genet.* 2001;92(1-2):134-8.
- Shivdasani RA: Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells.* 2001;19(5):397-407.

- Shubitowski DM, Venta PJ, Douglass CL, Zhou RX, Ewart SL: Polymorphism identification within 50 equine gene-specific sequence tagged sites. *Anim Genet.* 2001 Apr;32(2):78-88.
- Sinha S, Maity SN, Seldin MF, de Crombrughe B: Chromosomal assignment and tissue expression of CBF-C/NFY-C, the third subunit of the mammalian CCAAT-binding factor. *Genomics.* 1996 Oct 15;37(2):260-3.
- Solinas-Toldo S, Lengauer C, Fries R: Comparative genome map of human and cattle. *Genomics.* 1995 Jun 10;27(3):489-96.
- Soller M, Beckmann JS: Molecular mapping of quantitative genes. *Proc. 4th World Cong. Genet.Appl.Livest.Prod., Edinburgh, 1990.*93-96
- Soller M, Beckmann, JS: Mapping Trypanotolerance Loci of the N'Dama Cattle of West Africa. Consultion Report, FAO, Rome, 1988.
- Soller M: Statistical Designs and Analyses for QTL Mapping. In: *Bovine Genome, Mapping and Trypanotolerance. Proceedings of a workshop at ILRAD.* Ed. by Teale AJ., 1991.
- Spitznagel JK, Cooper MR, McCall AE, DeChatelet LR, Welsh IR: Selective deficiency of granules associated with lysozyme and lactoferrin in human polymorphs (PMN) with reduced microbicidal capacity. *J. Clin. Invest.* 1972. 51: 93A only.
- Stapleton D, Woollatt E, Mitchelhill KI, Nicholl JK, Fernandez CS, Michell BJ, Witters LA, Power DA, Sutherland GR, Kemp BE: AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett.* 1997 Jun 16;409(3):452-6.
- Stewart JL: The West African Shorthorn cattle. Their value to Africa as trypanosomiasis resistant animals. *Vet Rec.* 1951. 63,454-7.
- Stone RT, Pulido JC, Duyk GM, Kappes SM, Keele JW, Beattie CW: A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mamm Genome.* 1995 Oct;6(10):714-24.
- Strachan T, Read AP: *Human Molecular Genetics.* BIOS Scientific Publishers Limited, 1996.
- Syvaoja JE: DNA polymerase epsilon: the latest member in the family of mammalian DNA polymerases. *Bioessays.* 1990 Nov;12(11):533-6.
- Tautz D: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 1989 Aug 25;17(16):6463-71.
- Teale AJ: Genetics of Disease Resistance. In: *The Genetics of Cattle / edited by R. Fries and A. Ruvinsky.* CABI Publishing, 1999.
- Teale AJ: ILRAD-Report 1991.
- Teale AJ: Improving control of livestock diseases. *Animal Biotechnology in the Consultative Group for International Agriculture Research.* Bioscience 1993. 43:475-83.
- THE INTERNATIONAL SNP MAP WORKING GROUP: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001 Feb 409, 928-933.

- Thomsen H, Reinsch N, Xu N, Bennewitz J, Looft C, Grupe S, Kuhn C, Brockmann GA, 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, Kalm E: A whole genome scan for differences in recombination rates among three *Bos taurus* breeds. *Mamm Genome*. 2001 Sep;12(9):724-8.
- Touratier L: Challenges of non-tsetse transmitted animal trypanosomoses (NTTAT). An outline and some perspectives. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;916:237-9.
- Trail JC, D'Ieteren GD, Teale AJ: Trypanotolerance and the value of conserving livestock genetic resources. *Genome*. 1989;31(2):805-12.
- Tsai LH, Harlow E, Meyerson M: Isolation of the human *cdk2* gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature*. 1991 Sep 12;353(6340):174-7.
- Uimari P, Thaller G, Hoeschele I: The use of multiple markers in a Bayesian method for mapping quantitative trait loci. *Genetics*. 1996 Aug;143(4):1831-42.
- van der Waaij EH, Hanotte O, Kennedy D, de Koning DJ, Teale AJ, van Arendonk JAM, Gibson J: Genetic parameters and imprinting of QTL related to trypanotolerance in African cattle. 52 nd annual Meeting of the EAAP, Budapest, 26-29 August 2001
- van Wagendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos AP, Merton JS, den Daas JH, Kemp B, de Ruigh L: Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*. 2000 Jan 15;53(2):575-97.
- Visscher P, Pong-Wong R, Whittemore C, Haley C: Impact of biotechnology on (cross)breeding programmes in pigs. *Livest. Prod. Sci.*. 2000 Jul 1;65(1-2):57-70.
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lander ES, et al.: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 1998 May 15;280(5366):1077-82.
- Wang Q, Murphy N, Black SJ: Infection-associated decline of cape buffalo blood catalase augments serum trypanocidal activity. *Infect Immun*. 1999 Jun;67(6):2797-803
- Wehner R, Gehring W: *Zoologie*. G. Thieme-Verlag, 23. Auflage 1995.
- Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA: A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*. 1998 Feb 20;92(4):451-62.
- Weikard R, Goldammer T, Kuhn C, Barendse W, Schwerin M: Targeted development of microsatellite markers from the defined region of bovine chromosome 6q21-31. *Mamm Genome*. 1997;8(11):836-40.
- Weller JI, Kashi Y, Soller M: Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 1990 Sep;73(9):2525-37.

- Wesley CS, Ben M, Kreitman M, Hagag N, Eanes WF: Cloning regions of the *Drosophila* genome by microdissection of polytene chromosome DNA and PCR with nonspecific primer. *Nucleic Acids Res.* 1990 Feb 11;18(3):599-603.
- Whitelaw DD, Macaskill JA, Holmes PH, Jennings FW, Urquhart GM: Genetic resistance to *Trypanosoma congolense* infections in mice. *Infect Immun.* 1980 Mar;27(3):707-13.
- Wienberg J, Stanyon R.: Chromosome painting in mammals as an approach to comparative genomics. *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Dec;5(6):792-7.
- Wienberg J, Stanyon R: Comparative painting of mammalian chromosomes. *Curr Opin Genet Dev.* 1997 Dec;7(6):784-91.
- Willam A: Grundsätze der Genomanalyse. Zentrale Arbeitsgemeinschaft österreichischer Rinderzüchter. 2001:16-22
- Womack JE, Johnson JS, Owens EK, Rexroad CE 3rd, Schlapfer J, Yang YP: A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. *Mamm Genome.* 1997;8(11):854-6.
- Womack JE, Kata SR: Bovine genome mapping: evolutionary inference and the power of comparative genomics. *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Dec;5(6):725-33.
- Womack JE, Moll YD: Gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and man. *J Hered.* 1986 Jan-Feb;77(1):2-7.
- Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJL: Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *New Eng. J. Med.* 335: 1363-1367, 1996.
- Yang YP, Womack JE: Parallel radiation hybrid mapping: a powerful tool for high-resolution genomic comparison. *Genome Res.* 1998 Jul;8(7):731-6.
- Yang YP, Rexroad CE 3rd, Schlapfer J, Womack JE: An integrated radiation hybrid map of bovine chromosome 19 and ordered comparative mapping with human chromosome 17. *Genomics.* 1998 Feb 15;48(1):93-9.
- Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, Masushige S, Fukamizu A, Matsumoto T, Kato S: Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet.* 1997 Aug;16(4):391-6.
- Yu J, Tong S, Whittier A, Kao FT: Three region-specific microdissection libraries for the long arm of human chromosome 2, regions q33-q35, q31-q32, and q23-q24. *Somat Cell Mol Genet.* 1995 Sep;21(5):335-43.
- Zhang B, Healy PJ, Zhao Y, Crabb DW, Harris RA: Premature translation termination of the pre-E1 alpha subunit of the branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase as a cause of maple syrup urine disease in Polled Hereford calves. *J Biol Chem.* 1990 Feb 15;265(5):2425-7.
- Zhu B, Smith JA, Tracey SM, Konfortov BA, Welzel K, Schalkwyk LC, Lehrach H, Kollers S, Masabanda J, Buitkamp J, Fries R, Williams JL, Miller JR: A 5x genome coverage bovine BAC library: production, characterization, and distribution. *Mamm Genome.* 1999 Jul;10(7):706-9.

7 Anhang

7.1 DNA, Kits, Enzyme, Chemikalien, Geräte und Computerprogramme

7.1.1 DNA

BAC-DNA	RZPD GmbH
BovRH12-DNA	Womack (Texas A&M University, USA)
BovRH5-DNA	Womack (Texas A&M University, USA)
chromosomenspezifische Bibliothek	Goldammer (FBN, Dummerstorf)
Maus-DNA	Firma Novagen
N'Dama-/Boran-DNA	ILRI, Kenia
somat. Hybridzelllinien-DNA	Womack (Texas A&M University, USA)

7.1.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide	BNI, Hamburg
	MWG
	Gibco/life technologies
Oligonukleotide (fluoreszenzmarkiert)	MWG
100bp DNA-Leiter	PeqLab

7.1.3 Reaktionssysteme (Analysekits)

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
NucleoBond BAC 100	Macherey-Nagel
PCR-Script™ Amp Cloning Kit	Stratagene

7.1.4 Enzyme

<i>Bsr</i> I-Restriktionsenzym	NE Biolabs
<i>Nco</i> I-Restriktionsenzym	Amersham/ Pharmacia
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase*	Stratagene
<i>Pst</i> I-Restriktionsenzym	NE Biolabs
<i>Rsa</i> I-Restriktionsenzym	Amersham/ Pharmacia
<i>Srf</i> I-Restriktionsenzym	Stratagene
<i>Sty</i> I-Restriktionsenzym	NE Biolabs
T4 DNA-Ligase:	Pharmacia
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Pharmacia
<i>Xho</i> I-Restriktionsenzym	Amersham/Pharmacia

7.1.5 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Sigma
Agar	Difco
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Boehringer
Bacto-Tryptone	Difco
Borsäure	Biomol
Bromphenolblau	Sigma
Chloramphenicol	Merck
dNTPs	HYBAID-AGS
EDTA	Sigma
Eisessig	Merck
Ethanol abs.	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Formamid	Merck
Gelatine	Sigma
Glukose	Merck
Hefeextrakt	Difco
IPTG (Isopropylthio- β -Galaktosid)	Biomol
Kaliumchlorid	Merck
Kasein-Hydrolysat	Merck
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck
NaCl	Merck
NaOH	Merck
Natriumazetat	Merck
Saccharose	Biomol
TEMED (N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Tris-Base	Biomol
Tris-HCl	Biomol
X-Gal (5-Brom-4Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid)	Gibco/life technologies
Xylen Cyanol	Serva

7.1.6 Geräte

377 DNA Sequenzer	AbiPrism
PCR-Maschinen:	Hybaid
Omnigene	MWG-Biotech
Primus 96 ^{plus}	Biometra
T3 Thermocycler	Sartorius
Feinwaage	Omnilab
Heizplatte	Sigma; Eppendorf
Zentrifugen	Heraeus
Brutschrank	Heraeus
Sterilbank	Heraeus
Hybridisierungsofen	Biometra
Thermomixer	Eppendorf
Vortex VF2	Janke & Kunkel
Wasserbad	GFL

Powersupply	Fröbel Labortechnik
Gelkammern	MWG-Biotech; Biometra; Kodak
UV-Tisch	Biorad
UV-Dokumentationsanlage	Biorad
UV/VIS Spectrometer	PerkinElmer
pH-Meter CG840	Schott

7.1.7 spezielle Computerprogramme

RHMAP Version 3.0 (Statistical Package for Multipoint Radiation Hybrid Mapping)
 Genehunter Version 2.0 beta
 Genescan™- und Genotyper™-Software (Applied Biosystems)
 SeqEd V 1.0.3© (Applied Biosystems)
 DNASIS-Mac Version 2.0 (Hitachi Software)

7.1.8 Internetseiten

<http://bos.cvm.tamu.edu>
<http://bos.cvm.tamu.edu/bovgbase.html>
<http://bos.cvm.tamu.edu/htmls/Bov5.html>
<http://corba.ebi.ac.uk/RHdb/Clients/ScoresFormat.html>
<http://linkage.rockefeller.edu/soft/gh>
<http://www.embl-heidelberg.de>
<http://www.gdb.org>
<http://www.genome.iastate.edu>
<http://www.marc.usda.gov>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
<http://www.ri.bbsrc.ac.uk>
<http://www.rzpd.de>
http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

7.2 PCR-Bedingungen der Typ-I- und Typ-II-Marker, sowie der STS-Marker

In den Tabellen sind die Gen-Bezeichnungen bzw. die Mikosatelliten- und STS-Marker-Bezeichnungen mit den entsprechenden Primern und deren Sequenzen (5'→3') dargestellt. Die PCR-Bedingungen geben die optimale Anlagerungstemperatur der Primer und die optimale Magnesiumchlorid-Konzentration in der PCR-Reaktion an.

Alle PCR-Reaktionen fanden nach folgendem Schema statt:

Denaturierung:	94°C	4min	} 35 Zyklen
Doppelstrangtrennung:	94°C	30sec	
Primeranlagerung:	spezifisch pro Primerpaar	30sec	
Primerverlängerung:	72°C	45sec	
abschließende Verlängerung:	72°C	7min	
Kühlung:	4°C		

Typ-I-Marker (Gene)

Gen (Abkürzung)	Primer: vorwärts (5'→3')	Primer: rückwärts (5'→3')	PCR- Bedingungen
CCNT1	CGCATTGTGTTTTAACTACTGATTCT	CACCTCTCCAATACCAGTAAAAA	58°C, 1.5mM MgCl ₂
CD9	CTGGACTGCTGTGGTTTGAC	ACCACGGCAATCCCAATAC	56°C, 1.5mM MgCl ₂
CD09-I(nestfo/re)	AGACTTGTGAGCAGCTCGTG	ACCACGGCAATCCCAATAC	60°C, 1.5mM MgCl ₂
CD09-II(fo/nestre)	CTGGACTGCTGTGGTTTGAC	CCGACCGAAGGGATTAACT	60°C, 1.5mM MgCl ₂
CDK2	GACTCTGTGGTACCGAGCAC	GGCGAGTCACCATCTGAGCAA	54°C, 2.0mM MgCl ₂
DCN	CAGGAGTGAGCCTTTTCAGC	TCATGTGGGAAAAACATCCA	58°C, 1.5mM MgCl ₂
DMT1	CCATTATATTCAGTAATGCTCCTG	CGATTCTTTAACACCAGCACCAC	53°C, 1.5mM MgCl ₂
GALGT	CAGCTGACCAGCTGCTCATAG	AGGCCAGTCCTGGAAG	58°C, 1.5mM MgCl ₂
GPD1	CTTTGGCGACAACACCAA	GTTCCGCCCTCCGTAACA	58°C, 1.5mM MgCl ₂
IGF1	ATTACAAAGCTGCCTGCC	CACATCTGCTAATACCTTACCCG	56°C, 1.5mM MgCl ₂
INF-γI	TTGTGACTGTTAGCTAGATGTGTT	ATACACATATTATGCCCATCTTTT	56°C, 1.5mM MgCl ₂
IFN-γII	TAGTGCCAGCATCCAAGTTC	TCTCAGAGCTGCCATTCAAG	56°C, 1.5mM MgCl ₂
ITGB7	CTACGGTCGTGTGAGCGACAT	CTCGCATGGTGTCTTGCAGCC	56°C, 1.5mM MgCl ₂
LALBA	ACTTGAAGGGCTACGGAGGT	GAGTGAGGGTTCTGGTCGTC	58°C, 1.5mM MgCl ₂
LYZ@	ATAAGCATCAATATGCTCATCACT	GAGAGTTTTTATATAGGAGCTGTG	54°C, 1.5mM MgCl ₂
MGF1	CCAGAACCCAGGCAGTTTAC	CTGTCAATCCTAAGGGAGCTG	60°C, 1.5mM MgCl ₂
MIP	GAGGGCCATATGTGCTGAGT	CATGTAGCAGATGGCACGAA	60°C, 1.5mM MgCl ₂
NF-E2	GTCGCAAGAGAAAGCTGGAG	TAGGGTCCGGTCGGCTTC	54°C, 2.0mM MgCl ₂
NF-YB	CATCTGAAGCAAGTGAAAGG	TTCCACATAACTGTCAAAGC	52°C, 1.5mM MgCl ₂
NTS	ATCAGTAAGGCAAGTGTTC	GGCAGCAGGAAATTCCTTCT	56°C, 1.5mM MgCl ₂
POLE	CTGTGGTTTTGGCATTGAC	TGCCAGAATAGATTGCTTGT	58°C, 1.5mM MgCl ₂
PPP1CC	AGAAGCCTAATGCCACGAGA	TGGGAGTGGAGAATCTTTCA	58°C, 2.0mM MgCl ₂
PRIM1	AACATCAAAAATGACAAATATGGA	TGAACACTAAAAGGGCTCTTC	54°C, 1.5mM MgCl ₂
PRKAG1	ACAAGCGCATCCTCAAGTTC	GGTGATCTGAGGAAACAACCA	60°C, 2.0mM MgCl ₂
PTPRB	CTGCCCTCCTACCTGGAATA	ACATTTTCCACCCAGGCTCT	58°C, 1.5mM MgCl ₂
SOCS2	AAAAGAGGCACCAGAAGGAA	GGTGGTGTGATGTGTAGA	60°C, 2.0mM MgCl ₂
SYB1	GCATCACAATTTGAGAGCAGTG	TCAGATAGTAACCCCTCCACCA	58°C, 1.5mM MgCl ₂
UNG	GTTTTGCTGCTCAACGCTG	CATAAGAGCCCCAGAGCAAG	58°C, 1.5mM MgCl ₂
VDR	CCCACCACAAGACCTACGAC	GGAATGTCAGAAGCCACAT	58°C, 2.0mM MgCl ₂
VWF	ACATTTCCAGAAACGCATC	TTCTGGCTGGCCGTAAG	56°C, 1.5mM MgCl ₂

Mikrosatelliten und STS-Marker

Marker	Primer fo (5'→3')	Primer re (5'→3')	PCR-Bedingungen
AGLA254	GCTGCTTGGCACAGGCAAA	GGATTAATTTCTGGACTCTG	56°C, 1.5mM MgCl ₂
AGLA293	GAAACTCAACCCAAGACAACCTCAAG	ATGACTTTATTCTCCACCTAGCAGA	54°C, 1.5mM MgCl ₂
BL23	TCAATCCCTGGGTCAGGAAG	CTTATTTCAAATTCGGTTGGG	56°C, 1.5mM MgCl ₂
BL37	GCAATCCACTCTCCAGGTG	CATTCATGTTGCTGTAATGGC	58°C, 1.5mM MgCl ₂
BL4	AAATTTTTCATCCTTCTTTCTGAC	TCACCCTGACTGTGAATGC	56°C, 1.5mM MgCl ₂
BM1819	AGCACTGTGGGAATTATGGG	TGGAATGAGCCAGCTCAAG	58°C, 1.5mM MgCl ₂
BM2830	AATGGGCGTATAAACACAGATG	TGAGTCTGTCCACCATCAGC	58°C, 1.5mM MgCl ₂
BM315	TGGTTTAGCAGAGAGCACATG	GCTCCTAGCCCTGCACAC	60°C, 1.5mM MgCl ₂
BM49	TCACTAAACCAGGGGGGG	GAGGCAGGCAAATCAGAAC	58°C, 1.5mM MgCl ₂
BM6026	GCAACTAAGACCCAACCAAC	ACTGATGTGCTCAGGTATGACG	56°C, 1.5mM MgCl ₂
BMS1248	GTAATTCTGGACACGACACACA	TTAAGGATATGCAGAGGGTGT	60°C, 1.5mM MgCl ₂
BMC1009	GCACCAGCAGAGAGGACATT	ACCGGCTATTGTCCATCTTG	58°C, 1.5mM MgCl ₂
BMS490	TCACCAGGAAAGTCTCTATTTGG	ATATGCATCAACTCACACTGCC	58°C, 1.5mM MgCl ₂
BMS772	TTGTGCAATCAAGTGTAAGTCTG	CTCACTAAGATGCCCTGGTGATC	58°C, 1.5mM MgCl ₂
BP1	AAAATCCCTTCATAACAGTGCC	CATCGTGAATCCAGGGTTC	56°C, 1.5mM MgCl ₂
BR2936	GAGCCTTGTTGGGCTACAGTC	GAAGATTGCAAATGGAAGACC	58°C, 1.5mM MgCl ₂
CA500	CAGACACGACTAAGCGACCA	CCTACAATAAAGCACGGGGA	56°C, 1.5mM MgCl ₂
ETH10	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA	CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	58°C, 1.5mM MgCl ₂
ETH152	AGGGAGGGTCACCTCTGC	CTTGACTCGTAGGGCAGGC	56°C, 1.5mM MgCl ₂
ETH2	CCCACAGTGCTGGCATGGCC	CCATGGGATTTGCCCTGCTAGCT	56°C, 1.5mM MgCl ₂
ILSTS022	AGTCTGAAGGCCTGAGAACC	CTTACAGTCCTTGGGTTGC	60°C, 1.5mM MgCl ₂
ILSTS034	AAGGGTCTAAGTCCACTGGC	GACCTGGTTTAGCAGAGAGC	55°C, 1.5mM MgCl ₂
ILSTS042	AGGATTCTTTACCTCCAAGG	TGGCTCTTCGTATCAGGTGG	55°C, 1.5mM MgCl ₂
ILSTS066	TGGAGGTTTGGGATTGGAGG	GAGTATGGAGTGAAGGAGGG	58°C, 1.5mM MgCl ₂
INRA104	TGTCAGACATGACTGAGTGAC	AAAAGAGATTGAAAGCGCCT	56°C, 1.5mM MgCl ₂
MAF23	GTGGAGGAATCTTGACTTGTGATAG	GGCTATAGTCCATGGAGTCGCAG	56°C, 1.5mM MgCl ₂
URB060	CCAGAGAAAGAGAACCAGCCCT	GCCCTGTTTAGCTTCTGCAGTA	58°C, 1.5mM MgCl ₂
STS-1	CCTGTGTTTGGTTCACAGGT	CATGACTCTTTGCCCGTACC	58°C, 1.5mM MgCl ₂
STS-3	GCATTGGCATTAAAAAGGAA	TCTCACTCACAGAGTGGCGTA	52°C, 3.0mM MgCl ₂
STS-5	AATTCCTGCTTTAGGGGAAG	TGCAGATAACTCCAGTGATGG	54°C, 1.5mM MgCl ₂
STS-6	TGTTCTGGCATTACCTGAG	GCTCACTCATGGTTGGTCAAG	54°C, 1.5mM MgCl ₂
STS-8	AGCAAGCACCCAAATACACA	AAAAATGAGTCCTGGGAGAATATAG	58°C, 2.0 mM MgCl ₂
STS-9	GCCAGTTTGGTCTGACACT	ACAGTGAGGACAGGGGACTG	58°C, 1.5mM MgCl ₂
STS11	CAATTGATTTAGGGCATGCTG	ACTTTCCTGATGCTCCATTGTC	52°C, 1.5mM MgCl ₂
STS12	CTTTGACTAATGACTTCCAGTTTTACA	GCTAGCATGATGGATGGTGA	60°C, 1.5mM MgCl ₂
STS13	TGAGCTGTGAAGCTGGAAGA	GAGGGACACAGCTAGTTTTTCTG	56°C, 1.5mM MgCl ₂
STS14	TTTCCCACCTAAAAGGCTGA	CTTGATGGGCTCTCTGGAAG	56°C, 1.5mM MgCl ₂
STS15	CACTTGACCTGGTTGGGTTTC	GAGTTAATGGGTAGCGCACA	56°C, 1.5mM MgCl ₂
STS16	ACCCAGGTTCAATTCCTCA	TGTGGGAAGTTCCAAATCAT	58°C, 1.5mM MgCl ₂
STS18	TTTGGTTGCAGCCTTCAAGT	CAAGCATGTCAATGTCAGCA	56°C, 1.5mM MgCl ₂
STS19	TGCTTAACCTTGACAATCACCAA	TTTTCTTTCTTACTTTACTGTATTGA	54°C, 1.5mM MgCl ₂
STS23	CCTTTTTGTTTCATCTGCTCATC	GGACATGAACCTTTGGTTAGTCC	56°C, 2.0mM MgCl ₂

7.3 Nukleotidsequenzen der Gen- und STS-Marker

Die Primersequenzen sind unterstrichen.

7.3.1 Genfragmente

CCNT1 (Zyklin T) 195bp

CGCATTGTTTTTAACTACTGATTCTGGACTAAGAAAAGTACTTCTCATATGAAATATGTCACCCT
TGTTGGACTAGGGAATAAATTAATATTGAGACATAGGTGGGAGGATGGTTGAGGGCCTTGGTTGTT
AATGTCTCCTGCCTCAGAAATTTAACTATTTTATTATAGTTTTTACTGGTATTGGAGAGGTG

CD9 (CD9 Antigen) Primerpaar 1: 1003bp

Primerpaar 2: (CD9-I) nest fo/re: 609bp

Primerpaar 3: (CD9-II) fo/nest re: 555bp

Primerpaar 1

CTGGACTGCTGTGGTTTTGACCGGGGTGCCAGAACAATTTCTCACCGACACCTGCCCCCAAAGAAT
TTAATTGACAGCTTGAAAACGAAGGGTAAGCTTAGCACAAGACCCTGTGCCTTGCCCAGCTGCTCT
GGGTAAATCCCACCAAAGCGGACATGCCTTCAGCCCCCTTGATCTGTGAGGACAGCACTGTGGTGC
TTCTTAAACACCTCTTCCCCGTGGGAAGCACCCAGGGTGGCTGTCTCCTTTCTCCCCTACCCTGGGT
CTCTAATTCCTCCAGGGCAGCAAATCAGAGACCGGAGAAGTAGCAAAGCATTCTAGCTGCCTACAG
CTGCTGGGCCTCCATCCAGCCATCTTGCACAGCGGGTGTCCCAGGCCTGGACTCTTGCCCTTAGA
CTTGAGCAGCTCGTGCATGTGAGCTGGAGCAAATGTACAAACATCCATAATAGTAATAGGAAGT
AACTCTATGGCCAGGCTTCCCTGGTGGCTCAATAGTAAAGAATCTGCCTGCCAATGCGGAAGACAC
AAGTTTAATCCCTTCGGTCGGGAACATCCCCTAGAGAAGGAAATGGCAACCCATTACAGTATTCTT
GTCTGGAAAATTTTCATGGACAGAGGAACCTGGGGGGCTACAGTCCATGGGGTCAGAAAAGAGTCG
GACACACTTAGCGACCAACAATAAAAAACCTATGGCCAGATTAGACACGGATCCAAAGCAGG
GGCCACGCCTCTTCCCTCCATGGCTTCTTGCCCAAACCTTGGGGGACCCTTCCCTGGTTCTCCTTTCTG
TCCATCCGCCAGTCCCCAGCCCTCGCTTTGCAACCACAGCACCCAGGGGTCAGATGAGTGCCATG
GAGGGGAGGGGTGAGCCTGGAGTAGGGCTATGTGTTTCATCTGGGTCTTGGTTTTCCACCAAGCCC
TGCCCTGAAGCCATCGACGAGATCTTCCGNANCAAATCCACATCACCGGCGCCGTGGGTATTGGG
ATTGCCGTGGT

Primerpaar 2

AGACTTGTGAGCAGCTCGTGCATGTGAGCTGGAGCAAATGTACAAACATCCATAATAGTAATAGG
AAGTAACTCTATGGCCAGGCTTCCCTGGTGGCTCAATAGTAAAGAATCTGCCTGCCAATGCGGAAG
ACACAAGTTAATCCCTCGGTCGGGAACATCCCCTAGAGAAGGAAATGGCAACCCATTACAGTATT
CTTGCTGGAAAATTTTCATGGACAGAGGAACCTGGGGGGCTACAGTCCATGGGGTCAGAAAAGAG
TGGACACA-CTTAGCGACCAACAATAAAAAACCTATGGCCAGATTAGACACGGATCC-
AAAGCAGGGGCCACGCCTCTTCCCTCCATGGCTTCTTGCCCAAACCTTGGGGGACCCTTCCCTGGTTC
TCCTTTCTGTCCATCCGCCAGTCCCCAGCCCTCGCTTTGCAACCACAGCACCCAGGGGTCAGATGA
GTGCCATGGAGGGGAGGGGTGAGCCTGGAGTAGGGCTATGTGTTTCATCTGGGTCTTGGTTTTCCA
CCAAGCCCTGCCCTGAAGCCATCGACGAGATCTTCCGAAGCAAATTCCACATCACCGGCGCCGTGG
GATTGGGATTGCCGTGGT

Primerpaar 3

CTGGACTGCTGTGGTTTTGACCGGGGTGCCAGAACAATTTCTCACCGACACCTGCCCCCAAAGAAT
TTAATTGACAGCTTGAAAACGAGGGTAAGCTTAGCACAAGACCCTGTGCCTTGCCCAGCTGCTCTG
GGTAAATCCCACCAAAGCGGACATGCCTTCAGCCCCCTTGATCTGTGAGGACAGCACTGTGGTGC
TCTTAAACACCTCTTCCCCGTGGGAAGCACCCAGGGTGGCTGTCTCCTTTCTCCCCTACCCTGGGTC
TCTAATTCCTCCAGGGCAGCAAATCAGAGACCGGAGAAGTAGCAAAGCATTCTAGCTGCCTACAGC
TGCTGGGCCTCCATCCAGCCATCTTGCACAGCGGGTGTCCCAGGCCTGGACTCTTGCCCTTAGAC
TTGTGAGCAGCTCGTGCATGTGAGCTGGAGCAAATGTACAAACATCCATAATAGTAATAGGAAGTA
ACTCTATGGCCAGGCTTCCCTGGTGGCTCAATAGTAAAGAATCTGCCTGCCAATGCGGAAGACACA
AGTTAATCCCTCGGTCGGGAACAT

CDK2 (Zyklin-abhängige Kinase 2) 107bp

GACTCTGTGGTACCGAGCACTGGAAATCCTTCTGGGCTGCAAATACTACTCCATAGCTGTGGACATCTGGAGCCTCGGTTGCATCTTTGCTCAGATGGTGACTCGCC

DCN (Decorin) 242bp

CAGGAGTGAGCCTTTTCAGCAACCCAGTCCAGTACTGGGAGATCCAGCCATCCACCTTCCGATGTGTCTATGTGCGTGCTGCCGTTTCAGCTTGAAACTACAAGTAGCTCCCAAGAAAACCTCATTTTTATAACCTGGCAAAATCCCATTAATGTCATTGCTCAGAAAAACAAAAAAACAAAAAAAGAAAACTAGATACTGGAAATCTATCTGCAATGTTGGATGTTTTTCCACATGA

DMT1 (Divalentes Eisentransportprotein 1) 397bp

CCATTATATTCAGTAATGCTCCTGTCTGTGTCCAGTTATTATAAACTGATTTCTGCTTATTGGCCTAGCTAAGCTTTTGAGAATGTGTCTACTCTATGAGTAGATGATAGAGCTTGGTCCAAGGCTGCAAGAGAAATGCTGAACCAGGAAAAAGTGTTCAGTGTGCTCAGCAGATGCTAGTGGCAAGTGTAGTGA TTTTCTATACATAGGTGAACATGGAAGCATGATTAGTGTGGATAATCAGGAATCGACTATTCTAA GGTGTGTCTCACAGGAGTTATTGTGACAATAGTATCAATAAGGCCCTTAGCAGCTGTTTTATTCTT TAGAATATTAATTAGATTCTCAACACATCCAGGCTCCCCAGGTGGTGCTGGTGTAAAGAATCG

GALGT (Beta-1,4-Azetilgalaktosaminyltransferase) 570bp

CAGGGTTTCCAGCTGCTCATAGCCCCTGCCAACTCCCCGCTACAGTACCCCTGCAGGGTGTGGAG GTCCAGCCCCTCAGGAGTATCTTGGTGCCAGGTGGGGAGGAGGGTCCAAGGGGAGGACCTAAACC ACTGTGAGGGTGGCAGAGCCCAGGCTGGGTGAGAAAGAATGAGGGAAGATTGGAATGCCAGGTGG GGGGCTTCTAATGAAAGGGAACTGGAGGTCAGGGAGGGCTCATGAGGTGGGAGATGGGGACAG AAGGGACTCTAGGGTTGTGGGGAATTGCCGAAGCCAACTGGAGAGGTTTATGGAGAAGGGTGTGT TCTTGCTGACTGGCTGAAGTTAGATGGACAGGCAGGGCAGGCCACACAAGACCTACTGCTTTGATG GGAAGGAGTGAGAAATCGGTTACTCTGGGCTATGCCCTACAATGTGCCCTGCTGTGGCCTCAATAG GAGGGATGGGTGAGAAGTTCTGTGCTGTGTGAGGTGAAAGAGGGAGGAGAAAGGGAGGAATCCC AAGCTGTCTGTGATTCTGGTTCCTCTCCTTGCTCCAGGACTGGGCCT

GPD1 (Glyzerol-3-Phosphaht-Dehydrogenase (NAD+) 1) 159bp

CTTTGGCGACAACACCAAGGCGGCGTGATCCGACTGGGGCTCATGGAGATGATTGCCTTCGCCAA GCTCTTCTGCCACGGCCCCGTGCTCCTCCGCCACCTTCTGGAGAGCTGCGGCATCGCCGACCTCATC ACGACCTGTTACGGAGGGCGGAAC

IGF1 (Somatomedin C) 264bp

ATTACAAAGCTGCCTGCCCTTTCCAGGTTCTAGGAAATGAGATCATTCCCCTCACTTGGCAACCAG GACGAGGGGTCATCCCAGCGCTGTCTCCATTCTAGTTACCCAGTCGTTTGAGGGTTAAAATCATA GAGTAGGCTTGAGATGGTCTTTTTTTTCATTCTTGTTTTTTAAATTTTGTGTTGGCTCTGGAATATAA AATTGCTCGCCATCCTCYACGAATATTCCTTTTCATACGGGTAAGGTGATTAGCAGATGTG

IFN- γ (Interferon γ) Primerpaar 1: Mikrosatellit**Primerpaar 2: 413bp****Primerpaar 1**

TTGTGACTGTTAGCTAGATGIGTTTTGTTTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGACTAAACAATCTCTG CTCAGTTTGCTATAGAGATTTAGAAGGGATTCATGAATCTTCCAAAAGATGGGCATAATATGTGTA T

Primerpaar 2

TAGTGCCAGCATCCAAGTTCAATAAACTTGAGGTACATTTTTACAGCAATTTATGGACTAATTTTA AGCCAATTTTTTATTGTGTTGTTTTATTTCCAGAATGCAAGTAGCCAGATGTAGCTAAGGGTGGG CCTCTTCTCAGAAATTTGAAGAATTGGAAGATGTAAGCTGAACATTTCCATTTGGCTGATTTT CCTGTTGCTTTTTTCTGATGGATAAATTCACATCAACCTCTCTTTGTGCTCTTTTCTCCAAGGAAA GTGACAAAAAATTATTCAGAGCCAAATGTCTCCTTCTACTTCAAACCTTTGAAAACCTCAAAG ATAACCAGGTCATTCAAAGGAGCATGGATATCATCAAGCAAGACATGTTTCAGAAGTTCTTGAATG GCAGCTCTGAGA

ITGB7 (Integrin beta 7) 494bp

CTACGGTCGTGTGAGCGACATTAAGGCATCCTCTGTGGAGGTACCTGGAGACTTGAGGAGAAGGGT
GGGGTCAGAGTGGCCCCCAAGGGCGTTGAGGCTCTGGGAACCTTCTTGATACCAAGGGCAGGAAT
CAGGCTGTGATATAGGGGTTGGAAGTTGTCTGACACACTCGAGAGGGAAATGGATGCACAGGAGC
AGATCAGCTCTAGGCAGCCCGTGATGGCATGTGGTGGCCAGTGGCTGTGGAGGATGGTTGTCACCC
TCTGTGTGGCCCTACCTCAGGCTTTGGCCGTTGCCAATGTGGAGTGTGTCACTGTCACGCCAACCCG
ACGGGCAGAGCATGTGAATGCAGTGGCGACACGGACAACCTGTGTCAGTCTGACGGAGGGTTCTG
CAATGGGCACGGACACTGCAATTGCGACCGCTGCCAGTGCAGACGCGGCTACTATGGTGCCCTTTG
TGATCAATGCTCGGGCTGCAAGACACCATGCGAG

LALBA (Laktalbumin alpha) 487bp

ACTTGAAGGGCTACGGAGGTGTCAGTTTGCCTGAATGTGAGTTCCTGCTATTTTGCTTTGTCCCAT
AATTCATCCTCTTCACTCTTTCCCTCCATTCTCTTCACTCTTTTCCCCCTCTACTTTTAATTATCAA
ACAATTCTCTTATTTGTTTACTCTTTTATTACATTTATTTATCTGCCTCTCCTTTTTCCCATTTGTCTGA
TCCTTTGGAACCTTTTACCTTAACAAGATACTCTGTGGTCTGCCATATTTGGAGATTGGTTGGAG
AGCCTTTTTCGGTCTGGGAATACAGGTCCTCATTTATGCTATAACATCCTTGAAATCTCT
TTTTCGTCTTTCTTTCAGGGGTCTGTACCGCGTTTCATACAGTGGTTATGACACACAAGCCATAGT
ACAAAACAATGACAGCACAGAATATGGACTCTTCCAGATAAATAATAAAATTTGGTGCAAAGACG
ACCAGAACCCTCACTC

LYZ (Lysozym) Mikrosatellit

ATAAGCATCAATATGCTCATCACTTACTTTAAACAGTTGTTAACACTCCAGCACATTTACTTCTTTAT
ATATATATATATATGTATATAAACTTCTTTTTGCTGAGTGATTTTAAAGGTGAATTAGAAACATTATG
ACATTTCAATTTATAAATTCTTTAGAATGAATCTCCAAAAACACAGCTCCTATATAAAAACTGTC

MGF1 (Mastzellfaktor 1) 903bp

CCAGAACCCAGGCAGTTTACTCCTGAGAAATTTTTGGAATTTTTAATAAATCCATCGATGCCTTCA
AGGACTTGGAGATAGTGGCTTCTAAAATGAGTGAATGTGTGATTTCCTCAACATCAAGTCCTGAAA
AAGGTAAGATATATATTCCTAATATAAATGTAGAAACCAAGACTGAATCTTTTATGTATAGGTAAG
AATCTACCTCTGACTCAAATATATATGTAGCTAGAAACAGACATGTGTGTGTATGTATGTCTAAAA
TAAAAGCAAATATCAGTGGCATGAAAAAAAAAACAGTTATATATTTGTTGGTGTTCAGCCCAACC
AATACTTAACCATCTTCAAAGTACAGAATTGCACATGAGTAANCGATATATGAGATAGTCACTCAT
TTTACCTGATATTTACTAGTAATATACAATTATATTCTTCTTCACTTCCAGTCTTCTTAATGTCCCC
TTCTCAAATCTTTTCTTAGGGGTCTAATTCTGAGTCATGAATTCTCATCTTCACTTACCCTGTA
CTGAGACTTCTCCCCGCTACCATCCCTATGATATGAAATTTTAATTTCACTTATTTTTGAAAAA
GTGATCAATTGCCAACCATTGTCATTATTTACATTTGTTCTGTAACGTGACTTTGGTGAATTTCTTAA
TAAAAATAGAAAAGCAGGACCAAGTATAAAATAAATAGGATCTGAATGATCCAGATTTGGGAAGC
AGGCCTGGAAAGTACTCTAATATTGCACTTCACTTTTGGAGACTCTTTAATTTATGTAAATCGCCA
TGCAACACTGACACATTATTGCTTTCTATTTAGATTCCAGAGTCAGTGTACAAAACCATTTATGTT
ACCCCTGTTGCAGCCAGCTCCCTTAGGAATGACAG

MIP (Hauptintrinsic Protein) 241bp

GAGGGCCATATGTGCTGAGTTCTTTGCCAGCCTCTTCTATGTCTTCTTTGGACTGGGGCCTCGCTG
CGCTGGGCCCCTGGACCTCTGCATGTCTTGCAGGTGGCTCTGGCCTTTGGCCTGGCCCTGGCTACAC
TGGTGCAGGCTGTGGGCCACATCAGTGGAGCCCATGTCAACCCTGCAGTCACTTTTGCCTTCTTGT
GGCTCCCAGATGTCCCTGCTTCGTGCCATCTGCTACATG

NF-E2(Kernfaktor 2 erythroider Genese 2.45kD) 110b

GTCGCAAGAGAAAGCTGGAGACCATCGTGCAGCTGGAGCGGGAACCTGGAGCGGCTGGGCAGCGA
GCGGGAGCGGCTTCTCCGGGCCCAGGGCGAAGCCGACCGACCCTA

NF-YB (Transkriptionsfaktor Y, B Untereinheit) 104bp

CATCTGAAGCAAGTGAAAGGTGCCATCAAGAGAAACGGAAGACAATCAATGGAGAAGATATTCTT
TTTGCCATGGCCACCTTAGGCTTTGACAGTTATGTGGAA

NTS (Neurotensin) 141bp

ATCAGTAAGGCAAGTGTTCCCTCTTGAAAATGAGCCTGCTGAATGTCTGCAGTCTTATAAATAAC
CTGAACAGCCAAGCTGAGGAAACAGGAGAGTTTCATGAGGAGGAGCTCATTACAAGAAGGAAATT
TCCTGCTGCC

POLE (DNA-Polymerase, ϵ Untereinheit) 255bp

CTGTGGTTTTGGCATTGACATTGAGACAACCAAACCTGCCCTCAAGTTCCAGATGCTGAGACCG
ACCAGATTATGATGATTTCCCTATATGATTGATGGTCAGGTGAGTGGGTGCCTTCTGGAGTGTGAGCT
CTCTGNAACCGGGACCAAGTCTGGTCTCCAAACCTGAACAGTGTCCACTCGTGGTTAGTATTTGTTT
GGTGACTAATGAGAGAATGGAGTCCACACAAGTGAACAAGCAATCTATTCTGGCA

PPP1CC (katalytische Untereinheit der Protein-phosphatase 1, γ Isoform) 250bp

AGAAGCCTAATGCCACGAGACCCGTCACACCTCCAAGGGGTATGATCaCAAAGCAAGCAAAGAAA
TAGATGTCATTTTGATACTGCCTAGTTGGGACTTGTAACATATAGTACATAACCTTCATTTTTAAAA
CTGTAATGTGTACTGGTCAGCTTGCTCAAATAGTGTGTTGTGGGGCTCCCCCTCCATTTTGACTTCA
TGAATGGTATTTGCTGGTTGTAACAGCAAATGAAAGATTCTCCACTCCA

PRIM (Primase 1) 128bp

AACATCAAAAATGACAAATATGGACCCTGGCTGGAGTGGGAGATTATGCTCCAGTACTGTTTTCCA
CGGCTGGATATCAATGTCAGCAAAGGAATCAATCATCTACTGAAGAGCCCTTTTAGTGTTCA

PRKAG1 (nichtkatalytische AMP aktivierte Proteinkinase γ 1) 135bp

ACAAGCGCATCCTCAAGTTCCTCAAGTTATTTGTAATTGCTCCTCACCTTCTTAGATACTGGTGGGA
GGAGTATCCAAGGTAGTTGGAGGGCCCTGAAAAAATGAAGGTGATGGTTGTTTCCTCAGATCA
CC

PTPRB1 (Protein-Tyrosinphosphatase, Rezeptortyp beta) 153bp

CTGCCCTCCTACCTGGAATACAGGCACAACGCCTCCATTCGGGTGTATCAGACCGATTATTTGCCA
GCAAATGTGCCGAAAGTCTGACAGCAACTCTAAGAGTTTCAACATTAAGCTTGGAGCAGAGATG
GAGAGCCTGGGTGGAAAATGT

SOCS2 (Hemmprotein 2 der Zytokinsignalkette) 301bp

AAAAGAGGCACCAGAAGGAACTTTCTTGATTAGAGATAGCTCGCATTACAGACTACCTACTAACAAT
ATCTGTAAAACATCAGCTGGACCAACTAATCTTCGAATCGAATACCAAGACGGAAAATTCAGATT
GGACTCTATCATATGTGTCAAATCCAAGCTTAAACAATTTGACAGTGTGGTTTCATCTGATCGACTAC
TATGTTCAGATGTGCAAGGATAAGCGGACAGGTCCAGAAGCCCCCGGAACGGCACTGTTACCTT
TATCTGACCAAGCCACTCTACACATCAGCACCACC

SYB1 (Synaptobrevin 1) 599bp

GCATCACAATTTGAGAGCAGTGCTGCCAAGCTAAAGAGGAAGTATTGGTGGAAAACTGCAAGGT
GAGTGTTCCTGTCCCCTCCCTGTTATTTTCTGGGTCTCAACGCACAGGGGGCAGGAAAACCCTTAN
GTTCCACATTCTCTGTGGAATGTGGAATGGTTCACATCCTCTGCTGGCGCCTCTTTGAGAGGAAA
TCTGNATCGCCGTTTCTTAAGCTGNATTACCCAAGCTAGCCACCAGGGTACGCTAGAGCACTCAG
AACCACTCACTGGGGGCCCTGAAGACCTTAAGGAGTTTGGAGGGGTTAGTCAAGCTGCTTTTTCT
GGAGGACCCCTGAAAACCCTTCCGAAGACACACCAATGTGCACACAATGGCTGGGGTAGATACAT
ATTTAAACACCTGCAGCTCTGGGGAATGAGCTGAACACTTTATGATGAACAATGAACCTGATGAC
TAAAGTTCAAAGTTGGCGTCTCCTCTGGTGTTCCTTTGAAAGCCTCCAAGCTACAGGAAGAGGGG
AAAAGGAGAAGGCTGCAGATGCTCTGATGTTTTCGAGAAGTCCAGCTGTGGTGGAGGGGTTACTA
TCTGA

UNG (Uracil-DNA-Glykosylase) 148bp

GTTTTGCTGCTCAACGCTGTCTCACGGTCCGGGCACATCAGGCCAACTCTCATAAAGAGAGAGGT
TGGGAGCAGTTCACCGACCCGTCGTGCTGGCTCAATCAGAACGCCACGGCCTTGTCTTCTTG
CTCTGGGGCTCTTATG

VDR (Vitamin-D-Rezeptor) 205bp

CCCACCACAAGACCTACGACGCCACCTACTCCGACTTCAGCCAGTTCGGGTATATGGGCTGGAGG
GCGAGGGGATCTGGGCACAGCACCTGGGGAGGGCTGGAAGCTGGTCTGCCCTTGACCTGGGGA
GGACTGCCCTCCTGTAAACAAAAGACCAGGGCTGGGGGAGGAAGGTGACCTCCAATGTGGGCTT
CTGACATTC

VWF (von-Willebrand-Faktor) 245bp

ACATTTCCCAGAAACGCATCCGTGTGGCCGTGGTGGAGTACCATGATGGCTCCCATGCCTACCTCG
CGCTGCAAGACCGGAAACGGCCATCTGAGCTTCGGCGCATTGCCGGGCAGGTGAAGTATGCGGGC
AGCGAGGTGGCTTCCACCAGCGAGGTCTTGAAGTACACGCTCTTCCAGATCTTCGGCAGGATTGAC
CGCCTGAGGCCTCTCGGTGGCCCTGCTGCTTACGGCCAGCCAGGAA

7.3.2 STS-Marker**STS-1 104bp**

CCTGTGTTTTGAGTTCCACAGGTATATTTCAGTTATTCCCCAGAAATAGCAACTAAGTGAATTTTTATCA
GACCTCCATGAATGTAGGGTACGGGCAAAGAGTCATG

STS-3 113bp

GCATTGGCATTAAAAAGGAAACAAGTCAGATACTTGTATGGAAATTAATCTGCTAAAATTAGAT
TTTTAAAAATAACTCCAAAAACAGTTTTACGCCACTCTGTGAGTGAGA

STS-5 167bp

AATTCCTGCTTTAGGGGAAGTATACACAGCTGCGCACCCAGCTGAAGGAGTGTTTTCCAAAAGCAA
AACAAACAAATAAATGAAAAATGGGTAATTACATGCATAAAGCCAATAGAGAGCACTTTTATGAN
AAAAAAGGGAATGTCCCATCACTGGAGTTATCTGCA

STS-6 209bp

TGTTCTGGCATTACCTGAGACAAAGCCTATACCACCATGAGAGGTCTGTGCTGAGGTATAGAAAC
TTATCTTTCATCAACCTAAATAAACCCACTNNGGCAGACACATTTGTTGATCAAAGTTCNTGTTTT
TATCTCAAATCTAAATTTGATTATTCCATCACTATTTGTGTCAGTAAGAATGAAACTTGACCAACCA
TGAGTGAGC

STS-8 163bp

AGCAGCAAGCACCCAAATACACAGAAAGGTTTAATTCTTGAACATGTTAGTAAACATTAAGTACG
GATGCAGTTCACACTGAGACTAGTCAAAAAATATCATTATTAAGTATACTTCAGGCTTTAGTAAAA
TATATACTATATTCTCCAGGACTCATTTTT

STS-9 210bp

GCCAGTTTGGTCCCTGACACTACTTCCCTTCTTCTTTCAGAGCAATCTCTTGTCTCTGTTTTCTGTAGA
ATGCCCTGGTAAGATGTCATTTGAATTAGAAAAGAAAAAGAAAGGAAGGAAGGAAGAAAAGAAAA
AAGAAAAGAAGGAAGGAAGATGGAAAAGAAGAAAAGAAAACCTTAAACAAAAAATACAGCTGTCAC
TCCTGTCCCCTGAC

STS-11 178bp

CAATTGATTTAGGGCATGCTGAAATGGCAGGATAGCTGACGTGTTTGTGGATTTATTGATGGAGAC
CAAGATTTGGGAGACGTTAAATCAATACTCATTGAAGGCATAGGAGTATATAAGATTTCTTAACAG
AGTATGTAGACAGAAAAGACTGTTGACAATGGAGCATCAGGAAAGT

STS-12 156bp

CTTTGACTAATGACTTCCAGTTTTACAACATTTAAACCCTACAGTAAGTCTNTCATTCTATGCCACT
CTGCAGTTGACATGTTGCTAGCTAGTTTAGGGTTGGGATATGAGGTAGGCAGCTGGGTCATGTGT
CTTTCACCATCCATCATGCTAGC

STS-13 176bp

TGAGCTGTGAAGCTGGAAGATTAAGTAGACTCAAGGTTAGAATGTGCATTTGGACAATGAAAATTA
ACCAAAGTTAAATTTTGGAGAGGAGGAAAAGAGAGGGAAAAGAAAAGGAAAGCATAGAGAAAAGC
AGATAATTGAGCAACACCTAAAACAGAAAACTAGCTGTGTCCCTC

STS-14 177bp

TTTCCCACCTAAAAGGCTGAGCAGAGTGCTCTGTGGTCCCCCTCAGTGGTGGCACAGCTGGGACAC
GTGTGGCTCCAGGGTAAGCCACGGTATTAAGAAAAGTGGGGAGGACTTGGGGCCCTGCTGCTGGA
GTAAGTGGATCTTCAGATCTTCATCTCTTCCAGAGAGCCCATCAAG

STS-15 134bp

CACTTGACCTGGTTGGGTTTCAGCTTGAAATTCTGTCCAGCCTCCAGTGGATGGTGATTCCAAAGTT
GGTTCAGTTTTCTTAGCTTTTGCAGTGCTATTTAGATCTGCTTTGCATGTGCGCTACCCATTAACTC

STS-16 194bp (Mikrosatellit)

ACCAGGTTCAATTCCTCAGAGGGGAAGATCCCTTAGAGAAGGGTAGCAACCCATTCCAGTATTCT
TGCCTGGAGAATTTTATGGAGAGAAGAGCCTGGCAAGCTACAGTTCATAGGGTCACAGACACGAC
TGAGGAACATAACCCACACACACACACACACACATACACACATGATTTGGAAGTTCCACA

STS-18 131bp

TTTGGTTGCAGCCTTCAAGTCTGATAGGAATCAAGCTCTTCAATTGAAAGCCTATTAAGTAGCA
TCAAGGTTAATGAAGAgCAAGCTAGATCTCCTGAGAATAATGCATGCTGACATTGACATGCTTG

STS-19 165bp

TGCTTAACCTTGACAATCACCAAACCTACAACAGTAGCACTCTTANAGAANAAAAGTAGCAATCAT
TTACTTTTAAATCAGGATCAAGATGAAATTTCTCTAACACTATGAAGTTCAGTTATGTACTTAGCAT
TCTTATCAATACAGTAAAGTAAGAAAAGAAAA

STS-23 162bp

CCTTTTGTTCATCTGCTCATCAAACCTTATACTGTTTCAAGATACTTGTACTTCTCTTATGGCGCT
TGTTACCATACTTGTACTTTGATTGTCGTTTGTGTACATTTCTTACCTCTTCTAAACTGTTTCATCTGA
GAGGGACTAACCAAAGTTCATGTCC

7.4 Abkürzungen und genauere Beschreibungen der Phänotypen

PCV	<i>packed cell volume</i> , Hämatokrit
BW	<i>body weight</i> , Körpergewicht
PAR	<i>parasitaemia</i> , Parasitämie
DR	<i>detection rate</i> , Detektionsrate
F	<i>final</i> , am Ende der Infektion
I	<i>initial</i> , am Anfang der Infektion
V	<i>variance</i> , Varianz
M	<i>minimum</i> , Minimum
D	<i>day</i> , Tag
Ln	<i>natural logarithm</i> , natürlicher Logarithmus zur Ebene e
Mean	<i>mean</i> , durchschnittlich

7.4.1 Phänotypen, die Trypanotoleranz nicht direkt beschreiben

Hämatokrit (PCV): durchschnittlicher Hämatokritwert zum Ausgangszeitpunkt der Studie (**PCV I**), gemessen von Tag (-21) bis zum Tag (0) vor der Infektion

Gewicht (BW): durchschnittliches Körpergewicht zum Ausgangszeitpunkt der Studie (**BW I**), gemessen von Tag (-21) bis zum Tag (0) vor der Infektion; (**BW Mean**) durchschnittliches Körpergewicht nach der Erkrankung

7.4.2 Phänotypen, die die Trypanotoleranz beschreiben

Hämatokritwerte: **PCV F** = Hämatokritwert am Tag (150) oder am letzten Tag vor Therapiebeginn
PCV M = minimaler Hämatokritwert, der in dem Zeitraum Tag (0) bis Tag (150) nach der Infektion gemessen werden konnte
PCV I-F = PCV I minus PCV F
PCV I-M = PCV I minus PCV M, der in dem Zeitraum Tag (0) bis Tag (150) nach der Infektion gemessen wurde
PCV F-M = PCV F minus PCV M, der in dem Zeitraum Tag (0) bis Tag (150) nach der Infektion gemessen wurde
PCV V = Varianz des durchschnittlichen PCV-Wertes in dem Zeitraum Tag (0) bis Tag (150)
PCVD150 = prozentualer Abfall des PCV-Wertes von Beginn Tag (0) bis zum Ende Tag (150) der Infektion
PCVD100 = prozentualer Abfall des PCV-Wertes bis zum Tag (100) der Infektion

Körpergewicht: **BW F/I** = finales Körpergewicht im Verhältnis zum anfänglichen Körpergewicht (BW I)
BWD150 = prozentualer Abfall des Körpergewicht-Wertes von Beginn Tag (0) bis zum Ende Tag (150) der Infektion

Parasitämie:

PAR Ln beschreibt den durchschnittlichen natürlichen Logarithmus von (N_i+1) , wobei N_i gleich der Anzahl der Parasiten am Tag i (zwischen Tag (11) und Tag (150) bei Infektion) ist

Ln PAR = der natürliche Logarithmus der durchschnittlichen Anzahl der Parasiten zwischen Tag (11) und Tag (150) bei Infektion

DR 60-150 = die Detektionsrate, wie oft bei einem Tier in dem Zeitraum von Tag (60) bis zum Tag (150) bei Infektion die Infektion anhand der Parasiten erkannt werden konnte

Diese Arbeit ist Teil des vom Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (BMZ) geförderten Projektes: „Entwicklung und Anwendung von genetischen Markern, die beim Rind mit Trypanotoleranz gekoppelt sind (*Development and application of genetic marker linked to bovine trypanotolerance genes*)“ zur genetischen Verbesserung von trypanotolerantem Nutzvieh. Dieses Projekt wird von den kooperierenden Arbeitsgruppen International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi (Kenia), dem Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN), Dummerstorf (Deutschland) und dem Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin, Hamburg (Deutschland) bearbeitet.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben, herzlich danken.

Frau Dr. A. Gelhaus und Herrn Prof. Dr. R.D. Horstmann danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg. Besonders bedanken möchte ich mich für die Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.

Herrn PD Dr. B. Müller-Myhsok danke ich herzlich für seinen Einsatz bei dem statistischen Teil der QTL-Kartierung.

Herrn Prof. Dr. H.P. Mühlbach vom Institut für allgemeine Botanik der Universität Hamburg danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die DNA der verschiedenen Hybridzelllinien danke ich Prof. J.E. Womack. Herzlicher Dank geht an J. Elliott für die statistische Analyse der SCH-Panel-Ergebnisse.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Abteilung Molekulargenetik des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin. Die Hilfsbereitschaft und das Arbeitsklima sind großartig.

Für die freundliche Aufnahme, die Betreuung und Hilfsbereitschaft im International Livestock Research Institute (ILRI) in Nairobi danke ich ganz besonders Prof. Dr. J. Gibson, Herrn Dr. O. Hanotte, Frau Dr. P.R. Nilsson und Herrn Dr. S. Kanga. Dem Team aus Labor 7 verdanke ich mein schnelles Einleben in Kenia und eine gute erfolgreiche Arbeitszeit.

An dem Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) in Dummerstorf möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Schwerin, Dr. T. Goldammer und Dr. R. Brunner für die gute Kooperation und Hilfsbereitschaft danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt all denen, die mich in jeglicher Hinsicht bedingungslos unterstützt haben und dadurch das Anfertigen dieser Arbeit möglich gemacht haben.

Frau C. Fich, Frau S. Polzer, Herr H. Bublitz und Herr M. Hess seien hier besonders erwähnt.

Lebenslauf

Name: Karin Rottengatter
Geburtsdatum: 13. 11. 1966 in Brelingen / Wedemark

Schulbildung

1972 – 1976 Grundschule Brelingen
1976 – 1986 Gymnasium Mellendorf
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung und Berufstätigkeit

1986 – 1988 Ausbildung zur Zytologie-Assistentin
1988 – 1990 Berufstätigkeit als Zytologie-Assistentin
1997 – 1998 Berufstätigkeit als Zytologie-Assistentin

Studium

1990 – 1997 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel
Fächer: Zoologie, Mikrobiologie, Biochemie
1996 – 1997 Diplomarbeit
Thema: „Genetische Untersuchungen über Verwandt-
schaftsbeziehungen bei *Anas platyrhynchos* (Stockente)“
seit 1998 Promotion am Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin bei
Prof. R.D. Horstmann und Dr. A. Gelhaus