

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Tierzucht

Molekulargenetische Aufklärung von zwei Erbkrankheiten
der Fleckvieh-Population

Simone Jung

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Windisch

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H.-R. Fries
2. Univ.-Prof. Dr. G. Knubben-Schweizer
(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 11.06.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.10.2013 angenommen.

MEINER FAMILIE GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	viii
1 Einleitung	1
1.1 Das Deutsche Fleckvieh.....	1
1.2 Die Erbfehlerproblematik in Rinderpopulationen.....	2
1.3 Molekulargenetische Methoden zur Identifizierung ursächlicher Mutationen.....	4
1.4 Berücksichtigung von Erbfehlern in Zuchtprogrammen.....	7
1.5 Bovine hereditäre Zinkdefizienz und Thrombozytopathie.....	9
1.5.1 Bovine hereditäre Zinkdefizienz (BHZD).....	9
1.5.2 Hereditäre Thrombozytopathie bei Simmental-Rindern (HTS).....	10
1.6 Zielsetzung.....	12
2 Tiere, Material und Methoden.....	13
2.1 Tiere.....	13
2.1.1 BHZD-ähnliches Syndrom.....	13
2.1.2 Thrombozytopathie.....	13
2.1.3 Fleckvieh-Tiere der genomweiten Re-Sequenzierung.....	14
2.2 Material und Methoden.....	15
2.2.1 <i>In silico</i> Analyse.....	15
2.2.1.1 Auswahl und Annotation der Kandidatengene.....	15
2.2.1.2 Genomische Charakterisierung von Kandidatengenomen.....	15
2.2.1.3 Sequenz- und Polymorphismen-Analyse.....	17
2.2.2 Isolierung und Evaluierung genomischer DNA.....	18
2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Sperma.....	18
2.2.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Blut.....	19
2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Haaren.....	19
2.2.2.4 Qualitätskontrolle und Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	19
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	20
2.2.3.1 Primerdesign.....	20
2.2.3.2 Standard-PCR.....	21
2.2.3.3 PCR-Optimierung.....	21
2.2.3.4 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	22

2.2.4 DNA-Re-Sequenzierung nach Sanger.....	22
2.2.4.1 Aufreinigung und Kapillargelelektrophorese auf ABI 3130XL.....	22
2.2.5 Genotypisierung.....	23
2.2.5.1 TaqMan®-Genotypisierung.....	23
2.2.5.2 Genomweite Genotypisierung und Qualitätskontrolle.....	24
2.2.5.3 Genomweite Assoziationsstudie.....	25
2.2.5.4 Haplotypenanalyse.....	25
2.2.6 Genomweite Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse.....	25
3 Ergebnisse.....	26
3.1 BHZD-ähnliches Syndrom.....	26
3.1.1 Phänotypische Manifestation	26
3.1.2 Analyse des <i>SLC39A4</i> -Gens.....	28
3.1.2.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse.....	32
3.1.3 Genomweite Assoziationsstudie.....	34
3.1.4 Identifizierung der krankheitsassoziierten Region	35
3.1.5 Analyse des <i>CRIP1</i> -Gens.....	38
3.1.5.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse	42
3.1.6 Analyse des <i>CRIP2</i> -Gens.....	43
3.1.6.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse.....	49
3.1.7 Genomweite Re-Sequenzierung eines betroffenen Tieres.....	51
3.1.7.1 Analyse des <i>PLD4</i> -Gens	52
3.1.7.2 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse.....	58
3.1.8 TaqMan®-Genotypisierung der p.W215X-Mutation.....	62
3.2 Thrombozytopathie (TCP).....	63
3.2.1 Phänotypische Manifestation.....	63
3.2.2 Analyse des <i>RasGRP2</i> -Gens.....	65
3.2.2.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse.....	70
3.2.3 TaqMan®-Genotypisierung der p.L234P-Variante.....	73
3.2.4 Genomweite Assoziationsstudie.....	74
3.2.5 Identifizierung der krankheitsassoziierten Region.....	75
3.2.6 Analyse des <i>FERMT3</i> -Gens.....	77
3.2.6.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse.....	81
3.2.7 Genomweite Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse.....	82

4 Diskussion.....	84
4.1 BHZD-ähnliches Syndrom.....	84
4.2 Thrombozytopathie	88
4.3 Die Schwierigkeiten bei der Suche nach kausalen Varianten.....	92
4.4 Schlussfolgerungen.....	94
5 Zusammenfassung	96
6 Summary.....	98
7 Danksagung.....	100
8 Literatur	102
9 Appendix.....	119
9.1 Erläuterung der Thrombozytenaggregationsmessung.....	119
9.2 Puffer.....	121
9.3 Übersicht der verwendeten Primer zur Re-Sequenzierung.....	121
9.4 Übersicht der analysierten Fleckvieh-Tiere.....	126
9.5 Übersicht der identifizierten Polymorphismen	130
9.6 Übersicht der Gene des homozygoten Bereichs auf BTA29.....	134
9.7 Übersicht der Genidentifikationsnummern (NCBI).....	136
9.8 Schematische Darstellung der Hämostase.....	137
9.9 Nukleotidsequenzen re-sequenzierter Gene mit Bereichen unbekannter Sequenzinformati- on.....	139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Primersequenzen der TaqMan®-Genotypisierung der <i>PLD4</i> - und <i>RasGRP2</i> -Varianten.....	23
Tabelle 3.1: Intron-Exon-Organisation des <i>SLC39A4</i> -Gens in UMD3.1.....	29
Tabelle 3.2: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des SLC39A4-Proteins.....	32
Tabelle 3.3: Polymorphismen im <i>SLC39A4</i> -Gen in 36 FV-Tieren.....	33
Tabelle 3.4: Intron-Exon-Organisation des <i>CRIP1</i> -Gens in UMD3.1.....	39
Tabelle 3.5: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des CRIP1-Proteins.....	41
Tabelle 3.6: Polymorphismen im <i>CRIP1</i> -Gen in der Deutschen FV-Population.....	42
Tabelle 3.7: Intron-Exon-Organisation des <i>CRIP2</i> -Gens	44
Tabelle 3.8: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des CRIP2-Proteins.....	48
Tabelle 3.9: Polymorphismen im <i>CRIP2</i> -Gen in 36 FV-Tieren.....	50
Tabelle 3.10: Genotyp-Verteilung der vier identifizierten Varianten in der krankheitsassoziierten Region auf BTA21.....	52
Tabelle 3.11: Intron-Exon-Organisation des <i>PLD4</i> -Gens in UMD3.1.....	54
Tabelle 3.12: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des PLD4-Proteins.....	57
Tabelle 3.13: Polymorphismen im <i>PLD4</i> -Gen in der Deutschen Fleckvieh-Population.....	61
Tabelle 3.14: Genotypen der Stoppmutation in <i>PLD4</i> für 2322 Rinder.....	62
Tabelle 3.15: Intron-Exon-Organisation des <i>RasGRP2</i> -Gens in UMD3.1.....	66
Tabelle 3.16: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des RasGRP2-Proteins.....	69
Tabelle 3.17: Übersicht der Polymorphismen von <i>RasGRP2</i> in 12 FV-Tieren.....	70
Tabelle 3.18: Genotypen der p.L234P-Variante der 101 FV-Rinder.....	71
Tabelle 3.19: Genotypen der Punktmutation (c.T911C, p.L234P) in <i>RasGRP2</i> für 2492 Rinder.....	73
Tabelle 3.20: Intron-Exon-Organisation des <i>FERMT3</i> -Gens in UMD3.1.....	78
Tabelle 3.21: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des FERMT3-Proteins.....	81
Tabelle 3.22: Übersicht der Polymorphismen des <i>FERMT3</i> -Gens in 12 FV-Tieren.....	82
Tabelle 9.1: Übersicht der verwendeten Primer mit Sequenz, Orientierung und genomischer Lokalisation.....	121
Tabelle 9.2: Übersicht der Tiere für die Untersuchung des BHZD-ähnlichen Syndroms.....	126
Tabelle 9.3: Übersicht der Tiere der Thrombozytopathie-Untersuchung.....	126
Tabelle 9.4: Übersicht der Tiere der genomweiten Re-Sequenzierung.....	129
Tabelle 9.5: Polymorphismen der genomweiten Re-Sequenzierung im <i>PLD4</i> -Gen.....	130
Tabelle 9.6: Übersicht der identifizierten SNPs aller Gene mit Identifikationsnummer.....	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 9.7: Gehalt auf BTA29:41.698.900 bp – 43.375.960 bp..... 134
Tabelle 9.8: Übersicht der Genidentifikationsnummern der verwendeten Proteine/Gene136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Männliches Rind der Rasse Deutsches Fleckvieh.....	1
Abbildung 3.1: Krankheitssymptomatik des BHZD-ähnlichen Syndroms beim Fleckvieh.....	27
Abbildung 3.2: Graphische Darstellung der Genstruktur von <i>SLC39A4</i>	28
Abbildung 3.3: Promotor-Sequenz-Vorhersage des <i>SLC39A4</i> -Gens.....	30
Abbildung 3.4: Multiples Alignment der <i>SLC39A4</i> -Proteinsequenzen verschiedener Spezies.....	31
Abbildung 3.5: Assoziation von 644.450 SNPs mit dem Krankheitsstatus acht betroffener und 1339 nicht-betroffener FV-Tiere	34
Abbildung 3.6: Genotypen der acht betroffenen Kälber und 45 zufällig ausgewählten Kontrolltieren der distalen Region auf BTA21 (67 Mb – 71,57 Mb).....	35
Abbildung 3.7: Homozygotiesegmente der betroffenen Kälber auf Chromosom 21	36
Abbildung 3.8: Graphische Darstellung der Genstruktur von <i>CRIP1</i>	38
Abbildung 3.9: Vorhersage der Promotorsequenz des <i>CRIP1</i> -Gens.....	39
Abbildung 3.10: Vorhersage der CpG-Inseln im 5'-Bereich des <i>CRIP1</i> -Gens.....	40
Abbildung 3.11: Multiples Alignment der <i>CRIP1</i> -Proteinsequenzen verschiedener Spezies.....	41
Abbildung 3.12: Darstellung der Genstruktur von <i>CRIP2</i>	44
Abbildung 3.13: Vorhersage der Promotorsequenz des <i>CRIP2</i> -Gens.....	45
Abbildung 3.14: Vorhersage der CpG-Insel im 5'-Bereich des <i>CRIP2</i> -Gens.....	46
Abbildung 3.15: Vorhersage der Transkriptionsfaktorbindestellen in der 5'-Region des <i>CRIP2</i> -Gens.....	47
Abbildung 3.16: Multiples Alignment der <i>CRIP2</i> -Proteinsequenzen verschiedener Spezies.....	47
Abbildung 3.17: Graphische Darstellung der Genstruktur von <i>PLD4</i>	53
Abbildung 3.18: Vorhersage der Promotorsequenz des <i>PLD4</i> -Gens.....	54
Abbildung 3.19: Vorhersage der Transkriptionsfaktorbindestellen in der 5'-Region des <i>PLD4</i> -Gens.....	55
Abbildung 3.20: Multiples Alignment der <i>PLD4</i> -Proteinsequenzen verschiedener Spezies.....	56
Abbildung 3.21: Re-Sequenzierung der <i>PLD4</i> -Stoppmutation in zwei homozygoten Trägern des krankheitsassoziierten Haplotyps.....	59
Abbildung 3.22: Krankheitssymptomatik der Blutgerinnungsstörung beim Fleckvieh.....	64
Abbildung 3.23: Graphische Darstellung der Genstruktur von <i>RasGRP2</i>	65
Abbildung 3.24: Vorhersage der Promotorsequenz des <i>RasGRP2</i> -Gens.....	67
Abbildung 3.25: Vorhersage der CpG-Inseln im 5'-Bereich des <i>RasGRP2</i> -Gens.....	67
Abbildung 3.26: Multiples Alignment der <i>RasGRP2</i> -Proteinsequenzen verschiedener Spezies. .	68

Abbildung 3.27: Vorhersage der Auswirkung der nicht-synonymen Polymorphismus auf die Funktion des bovinen RasGRP2-Proteins.....	72
Abbildung 3.28: Assoziation von 660.817 SNPs und 46 TCP-Tieren vs. 3305 Kontrolltieren mit dem Krankheitsphänotyp.	74
Abbildung 3.29: Darstellung der Genotypen von 32 Tieren des Probensets auf BTA29 (36 Mb - 50 Mb).....	75
Abbildung 3.30: Darstellung der Genotypen von 14 fraglichen Fällen des Probensets auf BTA29 (38 Mb – 50 Mb).....	76
Abbildung 3.31: Graphische Darstellung der Genstruktur von <i>FERMT3</i>	77
Abbildung 3.32: Vorhersage der Promotorsequenz des <i>FERMT3</i> -Gens.....	79
Abbildung 3.33: Multiples Alignment der <i>FERMT3</i> -Proteinsequenzen verschiedener Spezies...	80
Abbildung 3.34: ~ 80 kb Deletion in TCP_13.....	83
Abbildung 9.1: Ergebnis der Impedanzmessung mit Kollagen und ADP eines betroffenen und gesunden Tieres.....	120
Abbildung 9.2: Schematische Darstellung der Teilbereiche der Hämostase.....	137

Abkürzungsverzeichnis

A (Aminosäure)	Alanin
A (Nukleotid)	Adenin
ABI	Applied Biosystems
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
AUC	area under the curve
BHZD	bovine hereditäre Zinkdefizienz
BLAST	basic local alignment search tool
BNP	bovine neonatale Panzytopenie
bp	Basenpaar
BS	Brachyspina Syndrom
Bta	<i>Bos taurus</i>
BTA	<i>Bos taurus</i> Autosom
BV	Braunvieh
C (Aminosäure)	Cystein
C (Nukleotid)	Cytosin
CalDaG-GEF1	Ca ²⁺ and diacylglycerol regulated guanine nucleotide exchange factor 1
cDNA	komplementäre DNA
Cfa	<i>Canis familiaris</i>
CMV	komplexe vertebrale Malformation
CRIP1	cysteine-rich intestinal protein 1
CRIP2	cysteine-rich intestinal protein 2
D	Asparaginsäure
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DUMPS	Uridin-Monophosphat-Synthase-Defizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tags
FERMT3	Fermitin family member 3
FV	Fleckvieh
G (Aminosäure)	Glycin
G (Nukleotid)	Guanin
GAPs	GTPase aktivierende Proteine
GEFs	Guanine nucleotide exchange factors

GTP/GDP	Guanosintriphosphat/Guanosindiphosphat
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
H	Histidin
HD	high density
HF	Holstein-Friesian
HKD	(HxK(x)4D(x)6G(G/S)xN)-Motiv
Hsa	<i>Homo sapiens</i>
ILK	Integrin-verbundene Kinase
InDel	Insertion/Deletion
INF2	inverted formin, FH2 and WH2 domain containing
K	Lysin
kb	Kilobasen
L	Leuzin
LD	Linkage disequilibrium / Kopplungsungleichgewicht
LOM	Lebendohrmarke (Nummer zur Identifizierung eines Rindes)
MAF	minor allele fequency
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MgSO₄	Magnesiumsulfat
mM	Millimol
Mmu	<i>Mus musculus</i>
MOCS1	molybdenum cofactor synthesis 1
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N_e	effektive Populationsgröße
ng	Nanogramm
NGS	Next-Generation-Sequencing
NMD	nonsense-vermittelter mRNA Abbau
o. A.	ohne Angaben
OD	optische Dichte
OMIA	Online Mendilian Inheritance of Animals
P	probability/Wahrscheinlichkeit
P	Prolin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PKC	Phosphokinase C

PK-Puffer	Proteinase K-Puffer
PLA2G16	Phospholipase A2, Gruppe 16
PLCB3	Phospholipase C, beta 3
PLD1-6	Phospholipase D, family member 1-6
PLD4	Phospholipase D family, member 4
PX	Phox-Homologie-Domäne
R	Arginin
RasGRP2	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)
REM	Ras exchange motif
Rno	<i>Rattus norvegicus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC39A4	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4
SNP	single nucleotide polymorphismen
Ssc	<i>Sus scrofa</i>
SUOX	Sulfitoxidase
T (Aminosäure)	Threonin
T (Nukleotid)	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCP	Thrombozytopathie
TE	Tris-EDTA-Puffer
TM	Transmembran-Domäne
TMAF	Transkriptionsfaktor A, mitochondrial
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Unit
UMD	University of Maryland
UTR	untranslatierte Region
V	Valin
VEGFB	vascular endothelial growth factor B
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
µM	Mikrogramm
ZIP4	zrt- and Irt-like protein 4

1 Einleitung

1.1 Das Deutsche Fleckvieh

Das Fleckvieh (FV) ist eine so genannte Zwei- oder Doppelnutzungsrasse, bei der die Fleisch- und Milchleistung gleichermaßen eine Rolle spielen. Mit über 41 Millionen Tieren ist es die zweitverbreitetste Rinderrasse der Welt, davon gehören 3,66 Millionen FV-Tiere der Deutschen Fleckvieh-Population an (<http://www.fleckvieh.de/>). Das Deutsche Fleckvieh geht auf Rinder aus dem Berner Oberland (Simmental) zurück und wurde ab 1835 nach Deutschland importiert (AVERDUNK *et al.* 2001). Rasse-typische Merkmale sind der weiße Kopf mit oder ohne zirkulärer Augenpigmentierung, sowie ein weißer Unterbauch und eine weiße Schwanzquaste (Abbildung 1.1). Die Fellfarbe kann alle Farbabstufungen vom dunklem Rotbraun bis zu einem hellen Gelb aufweisen. Zudem kommen weiße Flecken oder Flächen in verschiedenen Mustern oder auch Punkten hinzu, die unregelmäßig über den restlichen Körper verteilt sind (<http://www.fleckvieh.de/>). Weiterhin sollten Rinder der Rasse Deutsches Fleckvieh ein ruhiges und friedliches Temperament aufweisen. Als Zuchtziel wird ein Zweitnutzungs-rind mit hoher Fleisch- und Milchleistung angestrebt, das die Funktionalität und Wirtschaftlichkeit auf hohem Niveau kombiniert (BRADE und FLACHOWSKY 2007). Eine Besonderheit dieser Rasse ist die genetische Hornlosigkeit, die dominant vererbt wird und deren Verbreitung sowohl in der Mutterkuhhaltung als auch in der Milchproduktion angestrebt wird.



Abbildung 1.1: Männliches Rind der Rasse Deutsches Fleckvieh

Quelle: Bayern-Genetik GmbH, FV-Bulle Witzbold
(Herdbuchnummer 188829)

1.2 Die Erbfehlerproblematik in Rinderpopulationen

Treten Missbildungen oder Krankheiten bei Tieren mit enger verwandtschaftlicher Beziehung gehäuft auf, liegt der Verdacht einer genetischen Ursache nahe. Erbfehler werden als genetisch bedingte Abweichungen von der Norm in Körperbau oder -funktion mit nachteiliger Wirkung auf die Lebensfähigkeit bzw. das Leistungsvermögen definiert (LENGERKEN *et al.* 2006). Sie sind sowohl in Rinderpopulationen als auch in anderen Nutztierpopulationen von Bedeutung, da ihr Auftreten nicht nur gravierenden Einfluss auf bestehende Zuchtprogramme haben kann, sondern oftmals auch zu erheblichen Tierleiden sowie substantiellen wirtschaftlichen Einbußen führt (SHUSTER *et al.* 1992). Daher stellt der richtige Umgang mit genetischen Prädispositionen in Nutztierpopulationen eine große Herausforderung an die Tierzüchter da. Durch die Verwendung moderner Reproduktionstechnologien (z.B. künstliche Besamung und Embryotransfer) ist es möglich, dass einzelne Bullen mehrere tausend Nachkommen produzieren (BALL und PETERS 2008). Allele für ökonomisch wertvolle Eigenschaften können dadurch schnell in einer Population verbreitet werden. Obwohl die Verpaarung sehr nah verwandter Tiere vermieden wird, sind Rinderpopulationen durch den vermehrten Einsatz einiger weniger Elitebullen für unerwünschte genetische Effekte besonders anfällig (AGERHOLM 2007). Der extensive Wiedereinsatz einzelner Tiere kann zu einer drastischen Reduzierung der effektiven Populationsgröße (N_e) und zur ungewollten Verbreitung schadhafter Allele innerhalb der einzelnen Rassen führen (CHARLIER *et al.* 2008). Durch eine geringe N_e und der damit verbundenen Entstehung enger Familienstrukturen können rezessive Merkmale unbemerkt über Generationen innerhalb der Familie weitergegeben und im genetischen Material der Population angereichert werden.

Die meisten bisher entdeckten genetischen Defekte und Erkrankungen beim Rind basieren auf einem autosomal-rezessiven Vererbungsmuster und sind nur dann phänotypisch manifest, wenn die krankheitsverursachenden Allele homozygot vorliegen (GENTILE und TESTONI 2006; WINDSOR und AGERHOLM 2009). Autosomal-rezessive Defekte können so über Generationen unbemerkt innerhalb einer Population verbleiben und plötzlich gehäuft auftreten (z.B. (HEALY 1996)).

Das Erkennen von homozygot vorliegenden, erblichen Indispositionen kann durch das frühzeitige Absterben des Embryos erschwert werden. Krankheiten wie die komplexe vertebrale Malformation (CVM) und das Brachyspina-Syndrom (BS) sind nur durch die genetische Analyse einiger weniger geborener Defekttäger identifizierbar (NIELSEN *et al.* 2003; CHARLIER *et al.* 2012). Erbliche Erkrankungen, die zum sofortigen Abort eines homozygoten Embryos führen, wie zum Beispiel die Uridin-Monophosphat-Synthase-Defizienz (DUMPS), bleiben durch das Fehlen

auffälliger Tiere weitestgehend unentdeckt und werden oftmals nur als eine Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit identifiziert (SHANKS *et al.* 1984). Bisher werden hauptsächlich Erbkrankheiten als Defekt erfasst, die sich perinatal manifestieren. Jedoch gibt es einige erbliche Erkrankungen, wie die bovine hereditäre Zinkdefizienz (BHZD), die erst einige Wochen nach der Geburt charakteristische phänotypische Symptome ausprägen (BRUMMERSTEDT 1977), so dass eine genetische Ursache solcher Erkrankungen nicht immer in Betracht gezogen wird.

Informationen über bekannte Erbfehler bei Tieren werden in öffentlichen Datenbanken, wie zum Beispiel OMIA (<http://omia.angis.org.au/home/>) (LENFFER *et al.* 2006), zusammengetragen. Gegenwärtig sind 369 genetische Defekte und Erkrankungen beim Rind bekannt, davon werden 117 durch einen mendelschen Erbgang erklärt und 75 autosomal-rezessiv vererbt. Von lediglich 70 der 369 identifizierten Defekte/Erkrankungen sind die kausalen Gene bzw. die verursachenden Mutationen bekannt (Stand April 2013). Die Verbreitung solcher Erbkrankheiten in Rinderpopulationen ist, vor allem durch den Einsatz künstlicher Reproduktionstechniken und der Strukturierung der Zuchtprogramme sowie dem weltweiten Einsatz der Besamungsbullen, ein nicht zu vernachlässigendes Problem geworden.

1.3 Molekulargenetische Methoden zur Identifizierung ursächlicher Mutationen

Seit der Veröffentlichung der bovinen genomischen Referenzsequenz (GIBBS *et al.* 2009) - eine erste Entwurfssequenz steht schon seit 2004 zur Verfügung - unterliegt die Methodik zur Identifizierung kausaler Varianten einem stetigen Wandel. Während noch vor einigen Jahren Testanpaarungen und Kopplungsanalysen die einzige Möglichkeit waren Rückschlüsse auf den Merkmalsstatus eines fraglichen Tieres zu erhalten (JOHNSON *et al.* 1980; IHARA *et al.* 2005; ABBASI *et al.* 2005), erlauben die neuesten molekulargenetischen Methoden eine Vielzahl von Tieren in kürzester Zeit zu überprüfen. Die Entwicklung hochdichter SNP-Arrays (single nucleotide polymorphism) und den dazugehörigen Hochdurchsatz-Genotypisierungsplattformen ermöglicht die Abfrage einer großen Anzahl von Genotypen für polymorphe Positionen (STEEMERS und GUNDERSON 2007; MATUKUMALLI *et al.* 2009). Die Genotypisierung einer ausreichend großen Stichprobe lässt Rückschlüsse über die genetische Diversität innerhalb und zwischen Populationen zu. Durch die Verwendung hochdichter SNP-Informationen für genomweite Assoziationsstudien (GWAS) ist die erfolgreiche Kartierung von Bereichen möglich, welche die phänotypische Ausprägung komplexer Merkmale oder genetischer Erkrankungen (Fall-Kontroll-GWAS) beeinflussen (z.B. (DRÖGEMÜLLER *et al.* 2011; MENOUD *et al.* 2012; WANG *et al.* 2012; HIRANO *et al.* 2012)). Das Ziel der GWAS ist dabei die Aufdeckung der Assoziation zwischen Genotypfrequenz und Merkmalsstatus (z.B. (McCARTHY *et al.* 2008; SAXENA *et al.* 2013)). Basierend auf dieser Assoziation kann die genetische Begutachtung der untersuchten Tiere vorgenommen werden. Besonders in Nutztierpopulationen ermöglicht die genomweite Analyse mittels hochdichter SNP-Panels nicht nur die Untersuchung komplexer Merkmale wie dem Milch-Fett-Gehalt (WANG *et al.* 2012; ZHAO *et al.* 2012) sowie die genomische Evaluierung von Populationen (KAROUI *et al.* 2012), sondern auch die Identifikation mendelscher Erkrankungen (CHARLIER *et al.* 2008; VANRADEN *et al.* 2011). Aufgrund des Vorhandenseins von Kandidatengenen innerhalb der assoziierten Bereiche ist, durch eine anschließende Feinkartierung dieser Regionen, die eindeutige Identifizierung der zugrunde liegenden genetischen Varianten vielfach möglich geworden (MEYERS *et al.* 2010; MENOUD *et al.* 2012). Bei Fall-Kontroll-GWAS reicht eine kleine Anzahl erkrankter Tiere aus um ein eindeutiges Assoziationssignal zwischen dem Marker und dem Merkmalsstatus zu erhalten. Nachteilig ist die Abhängigkeit genomweiter Assoziationsstudien von der Phänotypisierung der zu untersuchenden Tiere. Insbesondere Fall-Kontroll-GWAS sind dadurch anfällig für Phänokopien. Die falsche bzw. uneindeutige Identifizierung eines Phänotyps

kann zu falsch-positiven Assoziationssignalen führen und die erfolgreiche Kartierung genomischer Bereiche erschweren.

Die Verfügbarkeit hochdichter SNP-Informationen ermöglicht die systematische Identifizierung erblicher Defekte und Erkrankungen, die einem mendelschen Erbgang unterliegen. Mittels den gewonnenen SNP-Informationen können ausgedehnte, chromosomale Regionen identifiziert werden, die ausschließlich in den betroffenen Individuen homozygot vorliegen (Autozygotiekartierung) (z.B. (GULSUNER *et al.* 2011; TESTONI *et al.* 2012)). Erkrankungen, die einem autosomal-rezessiven Erbgang unterliegen, lassen sich so gut kartieren. Zudem kann die Abwesenheit homozygoter Segmente innerhalb einer Population einen Hinweis auf letale Erbfehler sein, die aufgrund der fehlenden Phänotypisierung nur schwer zu identifizieren sind (VANRADEN *et al.* 2011).

Die Bestimmung des Merkmalstatus eines Individuums ist auch dann möglich, wenn die kausale Variante nicht entdeckt werden kann. Hierfür ist es erforderlich, dass der Marker mit dem ursächlichen Polymorphismus im Kopplungsungleichgewicht (LD, linkage disequilibrium) liegt (HAYES *et al.* 2010). Ist ein Marker nah genug an der Substitution lokalisiert, bleibt die Assoziation auch über mehrere Generationen sichtbar. Dadurch sind Rückschlüsse über die phänotypische Ausprägung eines Merkmals oder einer Erkrankung auch ohne das direkte Auffinden der kausalen Variante möglich (z.B. (GEORGES *et al.* 1993; BUITKAMP *et al.* 2003)).

Die Aussagekraft genomweiter Assoziationsstudien ist stark von der Anzahl der untersuchten Marker abhängig, da die benötigte Markerdichte mit dem Ausmaß des Kopplungsungleichgewichts im Genom zusammenhängt (KHATKAR *et al.* 2008). Die Dichte der benötigten SNP-Marker steigt, je mehr Generationen zwischen den untersuchten Tieren und dem ersten Mutationsträger (Gründertier) liegen (DUNNER *et al.* 1997). Zudem ist sie von der durchschnittlichen Länge chromosomaler Bereiche mit einem hohen Grad an Kopplungsungleichgewicht abhängig. Innerhalb solcher Regionen reichen wenige SNPs zur Vorhersage des Haplotyps aus (MATUKUMALLI *et al.* 2009). Die Anzahl der benötigten Fälle zur Kartierung eines Defekts ist mit der Allelfrequenz der Mutation sowie der Anzahl der gesunden Kontrolltiere korreliert.

In den vergangenen Jahren erlaubte die hochdichte Genotypisierung in Verbindung mit genomweiten Assoziationsstudien die Identifizierung kausaler Polymorphismen verschiedenster Erkrankungen beim Menschen, bei Rindern und anderen Spezies (z.B. (TODD *et al.* 2007; CHARLIER *et al.*

2008; AWANO *et al.* 2009)). Darüber hinaus tragen die Ergebnisse dieser Untersuchungen besonders bei Nutztierpopulation zur Aufklärung komplexer, ökonomisch wichtiger Merkmale bei (z.B. (KOLBEHDARI *et al.* 2009; ZHAO *et al.* 2011; ONTERU *et al.* 2012; PAUSCH *et al.* 2012; UEMOTO *et al.* 2012)).

Die mittlerweile routinemäßige Genotypisierung männlicher Rinder im Zuge der genomischen Selektion (MEUWISSEN *et al.* 2001) führte in den vergangenen Jahren zu einer rasanten Modifikation bestehender Zuchtprogramme. Durch die Verfügbarkeit von Genotypinformationen einer großen Anzahl von Tieren im Rahmen der genomischen Zuchtwertschätzung kann nicht nur der genomische Wert eines Tieres erfolgreich bestimmt werden (MEUWISSEN *et al.* 2001), sondern auch Bullen mit schadhafte Allelen/Haplotypen erfasst werden (VANRADEN *et al.* 2011). Somit fördert die genomische Evaluierung der Tiere den intelligenten und zeitgerechten Umgang mit Erbdefekten und -erkrankungen in Nutztierpopulationen, wodurch eine neue Basis für den richtigen Umgang mit diesen Informationen in der Zucht geschaffen wird.

Zusätzlich zur Genotypisierung gewährt die genomweite Re-Sequenzierung einzelner Individuen einen direkten Einblick in die genetische Konstitution des Individuums (ECK *et al.* 2009; BRAS *et al.* 2012). Die Re-Sequenzierung des gesamten Genoms kann Aufschluss über den Genotyp einer sehr großen Menge variabler Positionen geben und gleichzeitig die direkte Feinkartierung der Gene ermöglichen (LESHCHINER *et al.* 2012). Durch die Fähigkeit, eine enorme Menge an Sequenzinformationen in einer kurzen Zeit und zu einem annehmbaren Preis zu generieren ist dieser Ansatz ideal für eine Reihe von Untersuchungen, wie die Re-Sequenzierung einer Gruppe von Kandidatengenomen, der Exome oder des gesamten Genoms (ZHANG *et al.* 2012). Schadhafte Allele bzw. heterozygote Anlageträger können frühstmöglich entdeckt und gegebenenfalls aus der Population eliminiert werden. Noch vor wenigen Jahren war dies nur über die Untersuchung der Nachkommen machbar, d.h. es bestand die Möglichkeit, dass ein Bulle vor seiner Identifizierung als Vererber eines schadhafte Allels eine große Anzahl an Nachkommen gezeugt hat und somit den Defekt weiter in der Population verbreitet hat.

Die SNP-basierte Feinkartierung erblicher Indispositionen mittels der Kombination aus Hochdurchsatz-Genotypisierung und genomweiter Re-Sequenzierung ist ein „state-of-the-art“-Ansatz, der zurzeit vermehrt zur Aufklärung genetischer Erkrankungen eingesetzt wird (CHARLIER *et al.* 2012; MENOUD *et al.* 2012; HIRANO *et al.* 2012). Durch die genomweite Re-Sequenzierung

kann erstmalig die gesamte genomische Variation einzelner Tiere erfasst werden, d.h. auch Varianten mit niedriger Allelfrequenz, welche bei GWAS unerkannt bleiben, da diese auf den gängigen SNP-Arrays nicht abgefragt werden (MATUKUMALLI *et al.* 2009). Die gleichzeitige Feinkartierung der Gene durch die genomweite Re-Sequenzierung ermöglicht zudem die sofortige Detektierung und Analyse von Sequenzunterschieden zwischen betroffenen und gesunden Tieren. Die erhaltenen Ergebnisse können dann zeitnah in bestehende Zuchtprogramme übernommen werden und somit zu einer Verbesserung der Tiergesundheit und des Zuchtfortschritts führen.

1.4 Berücksichtigung von Erbfehlern in Zuchtprogrammen

Grundsätzlich verursachen die meisten bekannten Erbfehler ein erhebliches Tierleiden. Hinzu kommt aber auch ein direkter finanzieller Schaden durch den Verlust der betroffenen Tiere, sowie eine Reihe indirekter Kosten. Bei der Spinnengliedrigkeit zum Beispiel können Kosten nicht nur durch den Verlust des Kalbes entstehen, sondern auch durch geburtsbedingte Schäden und einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit des Muttertieres sowie durch tierärztliche Behandlungskosten (DRÖGEMÜLLER *et al.* 2010; BUITKAMP *et al.* 2011). Darüber hinaus kann es durch das vermehrte Auftreten von genetischen Defekten und Erkrankungen innerhalb einer Rasse zu einem „Imageverlust“ und damit zu einem indirekten wirtschaftlichen Schaden kommen. Zudem entstehen weitere indirekte Kosten durch einen Verminderung des Zuchtfortschritt, die züchterische Entwertung der Trägartiere sowie die Bekämpfungskosten des Defekts im Zuchtprogramm (CASANOVA *et al.* 2003). Da es durch den verstärkten Einsatz künstlicher Reproduktionstechnologien schnell zu der ungewollten Verbreitung erblicher Indispositionen kommen kann, ist eine Berücksichtigung von Erbfehlern in den Zuchtprogrammen zwingend notwendig. Eine Eliminierung der genetischen Prädispositionen durch den strikten Ausschluss betroffener Tiere wird, neben dem Verlust genetischer Diversität, dadurch erschwert, dass es zwischen genetischen Erkrankungen und Leistungsmerkmalen zu positiven Wechselwirkungen kommen kann (z.B. (HOESCHELE und MEINERT 1990)). Es ist also möglich, dass heterozygote Träger einer erblichen Erkrankung einen Vorteil gegenüber homozygoten Nicht-Merkmalsträgern haben, auch wenn unklar bleibt, ob es sich um einen positiven Effekt des Defektlokus oder um eine Kopplung der beiden Merkmale handelt (THOMPSON *et al.* 2007; SARTELET *et al.* 2012). Durch die Selektion auf die positiven Merkmale der heterozygoten Tiere kann es zu einer unbeabsichtigten, stärkeren Verbreitung des Erbfehlers kommen.

Für den richtigen Umgang mit neuen erblichen Indispositionen in einer Nutztierpopulation müssen die aktuelle Verbreitung, die zukünftige Entwicklung und die ökonomischen Auswirkungen der Erkrankung berücksichtigt werden. Zudem müssen alle weiteren Maßnahmen unter den Aspekten des Tierschutzes, der Zucht und den wirtschaftlichen Gesichtspunkten betrachtet werden (EGGER-DANNER und WILLIAM 2003). Je nach Relevanz der einzelnen Punkte gibt es drei Möglichkeiten zum Umgang mit Erbfehlern in Nutztierpopulation:

1. Ausmerzen des Defekts bzw. der Erkrankung
2. Begrenzung des Defekts bzw. der Erkrankung
3. Überwachung des Defekts bzw. der Erkrankung

Der Umgang mit identifizierten Erbfehlern hat sich in den letzten Jahren gewandelt. Krankheiten wie die bovine hereditäre Zinkdefizienz bei Holstein-Friesian und die spinale Muskelatrophie beim Braunvieh wurden durch einen strikten Ausschluss heterozygoter Anlageträger von der Zucht und die Einstellung des Spermaverkaufs weitestgehend aus den heutigen Populationen eliminiert (AGERHOLM 2007). Im Gegensatz dazu steht die Begrenzung eines erblichen Defekts bzw. einer Erkrankung innerhalb einer Population. Ziel dieser Maßnahme ist die Stabilisierung der Frequenz des prädisponierenden Allels um die weitere Verbreitung zu verhindern. Trägartiere mit herausragenden Eigenschaften, die eventuell mit dem Defektallel vererbt werden, können kontrolliert weiter eingesetzt werden (EGGER-DANNER und WILLIAM 2003). Beispielsweise sieht das Braunviehzuchtprogramm vor, dass alle eingesetzten Besamungsbullen, die potentiell Träger eines bekannten Erbfehlers sein können, molekulargenetisch untersucht und gekennzeichnet werden (z.B. Arachnomelie) (CASANOVA *et al.* 2003). Dadurch kann nicht nur die Ausbreitung eines Erbfehlers sondern auch der Verlust gewünschter Eigenschaften sowie der ökonomische Schaden begrenzt werden.

1.5 Bovine hereditäre Zinkdefizienz und Thrombozytopathie

Durch die rasante Weiterentwicklung molekulargenetischer Untersuchungsmethoden konnte in den vergangenen Jahren die genetische Ursache einiger boviner Erbdefekte geklärt werden. Aufgrund ihrer Bedeutung für diese Dissertation werden im folgenden Abschnitt die „bovine hereditäre Zinkdefizienz“ und die „hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler-Rinder“ erläutert.

1.5.1 Bovine hereditäre Zinkdefizienz (BHZD)

Bei der bovinen hereditären Zinkdefizienz (BHZD), auch als erbliche Parakeratose oder als ‚lethal trait A 46‘ bekannt, handelt es sich um eine autosomal-rezessive Störung der transintestinalen Zinkpassage (MACHEN *et al.* 1996), die erstmals bei Rindern der Rasse Holstein-Friesian beobachtet wurde (McPHERSON *et al.* 1964; zit. n. MACHEN *et al.* 1996). Vereinzelt wurde das Auftreten der Zinkdefizienz auch bei Shorthorn und Angus Rindern berichtet (VOGT *et al.* 1988; TAMMEN 2002). Zudem sind erbliche Formen des Zinkmangels auch beim Menschen (*Acrodermatitis enterophthtica*) (KÜRY *et al.* 2002, 2003), bei Mäusen (DUFNER-BEATTIE *et al.* 2003, 2007), Ziegen (KRAMETTER-FROETSCHER *et al.* 2005) und einigen Hunderassen (JEZYK *et al.* 1986; McEWAN *et al.* 2000) bekannt. Betroffene Kälber sind aufgrund eines Defekts in der gastrointestinalen Zinkresorption unfähig eine ausreichende Menge Zink aus der Nahrung aufzunehmen. Durch die intrauterine Zinkversorgung werden betroffene Tiere symptomlos geboren, entwickeln aber im Laufe der ersten Lebensmonate charakteristische Krankheitsmerkmale (STÖBER 2002). Die Symptome der Zinkdefizienz äußern sich hauptsächlich durch Hautläsionen, Durchfall, Wachstumsstörungen und einer stark verminderten Immunleistung (BRUMMERSTEDT 1977). Die typischen Hautveränderungen treten häufig an mechanisch stark beanspruchten Stellen, wie z.B. der Maulumgebung sowie Nacken-, Achsel- und Kniefalten auf.

Da Zink ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems ist, neigen BHZD-Kälber durch die Beeinträchtigung der Immunsystemfunktionen zusätzlich vermehrt zu ernsthaften Sekundärinfektionen von Haut, Atem- und Verdauungswegen, denen sie ohne Behandlung erliegen. Die phänotypischen Auswirkungen des Mangels sind sowohl bei der bovinen als auch der menschliche Variante der Zinkdefizienz durch die orale Verabreichung konzentrierter Zinkpräparate therapierbar (BRUMMERSTEDT 1977; SEHGAL und JAIN 2000; STÖBER 2002). Die Einnahme des Spurenelements muss ein Leben lang erfolgen, das Absetzen der Präparate hat die sofortige Wiederkehr aller Symptome zur Folge.

Molekulargenetische Untersuchungen der hereditären Zinkdefizienz in Holstein-Friesian konnten zeigen, dass diese Erkrankung durch eine Punktmutation der Spleiß-Donor-Stelle (GT→AT) im Intron 10 des Zinktransporter-kodierenden Gens *SLC39A4* (*solute carrier family 39, member 4*) verursacht wird (YUZBASIYAN-GURKAN und BARTLETT 2006). *SLC39A4*, das den ZIP4-Transporter kodiert, ist hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt zu finden. Zusätzlich wird *SLC39A4* auch in den Nieren exprimiert, wo es für die Zinkresorption verantwortlich ist (EIDE 2004; ANDREWS 2008). Aufgrund dieser Mutation wird das zehnte Exon des Gens nicht in die mRNA übertragen, wodurch es zu einer fehlerhaften Ausprägung der funktionalen Transmembrandomänen IV und V des Transporters und damit zu einer unzureichenden Zinkversorgung betroffener Tiere kommt. Molekulargenetische Analysen des *SLC39A4*-Gens in Mensch und Maus konnten ebenfalls aufzeigen, dass eine Reihe verschiedener Mutationen in diesem Gen für die Zinkmangelsymptomatik verantwortlich ist (KÜRY *et al.* 2002, 2003; WANG *et al.* 2004; DUFNER-BEATTIE *et al.* 2007).

1.5.2 Hereditäre Thrombozytopathie bei Simmental-Rindern (HTS)

Erbliche Blutgerinnungsstörungen wurden bisher beim Menschen sowie bei Mäusen, Hunden und Rindern beschrieben (JOHNSTONE und LOTZ 1979; NAVARRE *et al.* 1995; GENTRY *et al.* 1997; CALLAN *et al.* 2001; BERGMEIER *et al.* 2007; BOUDREAUX *et al.* 2007a). Aufgrund der Komplexität der Hämostase kann die Ursache einer solchen Störung bei ähnlichen Phänotypen sehr unterschiedlich sein. Häufig basieren unklare Blutungen auf einer Störung der primären Hämostase. Dabei stellen Defekte der Thrombozytenfunktion eine wesentliche Ursache dar (KIRCHMAIER und PILLITTERI 2010). Bei solchen Störungen wird zwischen einer Thrombozytopenie und einer Thrombozytopathie unterschieden. Als Thrombozytopenie wird ein Blutbild mit stark verminderter Thrombozytenzahl bezeichnet (VAN OMMEN und PETERS 2012). Eine Thrombozytopathie hingegen zeichnet sich durch ein normales Blutbild aus, d.h. die Anzahl der Thrombozyten liegen im physiologischen Bereich. Jedoch ist die Funktion der Thrombozyten aufgrund von Störungen der Adhäsivität, der Thrombozytenrezeptoren, Freisetzungsstörungen der Plättcheninhaltsstoffe und Blockaden der Signaltransduktion nur eingeschränkt bis gar nicht vorhanden (KIRCHMAIER und PILLITTERI 2010). Die Schwere der Blutungsneigung variiert je nach Plättchenfunktionsstörung und kann durch andere koexistierende Hämostasestörungen gesteigert werden (KIRCHMAIER und PILLITTERI 2010).

Leipold und Moore beschrieben 1977 erstmals eine Blutgerinnungsstörung bei Simmental-Rindern, die durch eine Beeinträchtigung der Blutplättchenfunktion ausgelöst wird (LEIPOLD und MOORE 1977; zit. n. SEARCY und PETRIE 1990). Seither wurde im nordamerikanischen Raum vermehrt das Auftreten einer erblichen Thrombozytenfunktionsstörung bei Rindern dieser Rasse (hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder (HTS)) beschrieben (SEARCY und PETRIE 1990; SEARCY *et al.* 1990; FROJMOVIC *et al.* 1996; GENTRY *et al.* 1997; BOUDREAUX *et al.* 2007b). Das Krankheitsbild konnte bisher sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren in einem Alter zwischen wenigen Tagen und drei Jahren beobachtet werden (SEARCY und PETRIE 1990; STEFICEK *et al.* 1993a; NAVARRE *et al.* 1995). Betroffene Tiere haben in der Regel ein ungestörtes Allgemeinbefinden, leiden aber nach Verletzungen, Injektionen oder chirurgischen Eingriffen an zum Teil massiven, längerfristigen Blutungen der Haut sowie Blutungen der Nase und Schleimhäute. Vermehrt kommt es auch zu großflächigen subkonjunktivalen Blutungen, blutigen Beimengungen im Kot und der Bildung von Hämatomen (SEARCY und PETRIE 1990). Im Unterschied zu einer Thrombozytopenie, bei der es aufgrund einer starken Reduzierung der Blutplättchenanzahl zu klinischen Auffälligkeiten des Blutbilds kommt, liegt die Thrombozytenzahl erkrankter Tiere innerhalb der physiologischen Grenzwerte. Zudem konnten bei einem lichtmikroskopischen Vergleich der Thrombozyten gesunder und erkrankter Rinder keine morphologischen Unterschiede erkannt werden (STEFICEK *et al.* 1993b; SEARCY *et al.* 1994). Die Intensität der Blutungen zeigt eine große Variation in ihrem Erscheinungsbild (SEARCY und PETRIE 1990). Neben der auffälligen Verlängerung der Blutungsdauer durch kleinere Verletzungen und chirurgische Eingriffe, stellt insbesondere ein möglicher massiver Blutverlust im Rahmen der Abkalbung eine große Gefahr für betroffene Tiere dar (STEFICEK *et al.* 1993a). Weisser und Kollegen konnten 2010 erstmalig ein Tier mit einer erblichen Thrombozytenfunktionsstörung in der Deutschen Fleckvieh-Population identifizieren (WEISSER *et al.* 2010). Basierend auf dem Krankheitsbild wurde bei dem beschriebenen Fall HTS als Krankheitsursache vermutet.

Molekulargenetische Studien der kaninen und murinen Varianten erblicher Thrombozytenfunktionsstörungen, die einen dem bovinen Defekt ähnlichen Phänotyp zeigen, konnten Polymorphismen in einem Gen der Aktivierungskaskade der Thrombozyten, *RasGRP2* (RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)), als krankheitsverursachend identifizieren (BERGMEIER *et al.* 2007; BOUDREAUX *et al.* 2007a). Durch eine genaue genetische Analyse eines einzelnen betroffenen Kalbes konnte eine C→T-Substitution in Exon 7 des bovinen *RasGRP2*-

Gens aufgedeckt werden (BOUDREAU *et al.* 2007b). Durch diesen Polymorphismus kommt es zu einem Aminosäureaustausch (p.L234P) in einer strukturell wichtigen Domäne des Proteins, so dass es wahrscheinlich zu einer Störung der Aktivierungskaskade kommt. Darüber hinaus ist der tatsächliche Erbgang der Erkrankung weiterhin unklar. Kreuzungsexperimente ließen aber vermuten, dass es sich um einen autosomalen Erbgang handelt, der wahrscheinlich auf dem Zusammenspiel mindestens zweier Genorte beruht (MAPLETOFT *et al.* 2000).

1.6 Zielsetzung

Aufgabe einer verantwortungsvollen Tierzucht ist es, nicht nur die wirtschaftlichen Aspekte, sondern gerade auch das Wohl des Tieres in den Vordergrund zu stellen. Daher ist sowohl die Erkennung als auch der richtige Umgang mit Erbfehlern in Nutztierpopulationen von großer züchterischer Relevanz. Obgleich genetische Defekte in den Rinderpopulationen häufig vorkommen - das Rind hat nach Mensch und Hund die meisten bekannten genetischen Anomalien - sind bisher nur sehr wenige in der Deutschen Fleckvieh-Population entdeckt worden.

Das Ziel dieser Dissertation war die Aufklärung der molekulargenetischen Grundlagen von zwei kürzlich entdeckten Erbkrankheiten in der Fleckvieh-Population. Die Identifizierung der kausalen Varianten der untersuchten Erkrankungen soll die Implementierung direkter Gentests ermöglichen, so dass Anlageträger eindeutig identifiziert und Maßnahmen zur Eindämmung und Bekämpfung der Erbkrankheiten in der Fleckvieh-Population ergriffen werden können.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Tiere

2.1.1 BHZD-ähnliches Syndrom

Als Ausgangsmaterial der DNA-Extraktion standen gerinnungsgehemmte (1,6 mg EDTA/ 1 ml Blut) Blutproben von acht erkrankten Kälbern und Muttertieren zur Verfügung. Aufgrund eines Blutchimärismus wurde die DNA eines Muttertieres aus Haarwurzeln gewonnen. Alle erkrankten Tiere wurden im Vorfeld von Tierärzten der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität München untersucht und der Phänotyp genau bestimmt. Soweit die Tiere in der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung behandelt und euthanasiert wurden, standen Gewebeproben zur pathologischen Unterstützung und Bestätigung der Diagnose zur Verfügung. Zusätzlich wurde DNA möglicher Anlageträger (Auswahl aufgrund von Haplotyp- und Stammbauminformationen) sowie von Kontrolltieren aus Sperma präpariert. Insgesamt konnte so ein Fall-Kontroll-Probenset, bestehend aus 8 erkrankten Kälbern, 16 Anlageträgern und 12 Kontrolltieren zusammengestellt werden (Tabelle 9.2).

2.1.2 Thrombozytopathie

Als Ausgangsmaterial der DNA-Extraktion standen gerinnungsgehemmte (1,6 mg EDTA/ 1 ml Blut) Blutproben von insgesamt 101 Tieren zur Verfügung, von denen 44 Tiere als betroffen eingestuft wurden. Weiterhin standen Blutproben von 24 Kontrolltieren zur Verfügung (Tabelle 9.3). Alle betroffenen Tiere sowie die Kontrolltiere wurden im Vorfeld von Tierärzten der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität München untersucht und die Störung der Thrombozytenaggregation mittels Impedanzmessung (siehe Kapitel 9.1) bestätigt bzw. bei den Kontrolltieren ausgeschlossen. Zudem wurde die DNA aus Blutproben von 30 Tieren, bei denen eine Blutgerinnungsstörung diagnostiziert wurde aber keine Thrombozytenaggregationsmessung vorgenommen wurde bzw. die Messung uneindeutig war, mit aufgearbeitet. Darüber hinaus standen gerinnungsgehemmte Blutproben (1,6 mg EDTA/ 1 ml Blut) von vier im Rahmen der bovinen neonatalen Panzytopenie (BNP)-Untersuchung auffällig gewordene Kälber zur Verfügung, bei denen der BNP-Verdacht aber nicht bestätigt werden konnte.

2.1.3 Fleckvieh-Tiere der genomweiten Re-Sequenzierung

Für die Identifizierung interessanter Polymorphismen konnte auf die Sequenzinformation von 42 Fleckvieh-Tieren (Tabelle 9.4) zurückgegriffen werden (JANSEN *et al.* 2013). Diese Tiere, sowie ein erkranktes BHZD-ähnliches-Syndrom-Kalb (G4) und ein TCP-Kalb (TCP_13) wurden mit dem Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, USA) genomweit sequenziert. Neben den betroffenen Tieren, wurden Fleckvieh-Tiere für die Sequenzierung ausgewählt, die einen möglichst großen Teil der genetischen Variation (68%) dieser Rasse erklären.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 *In silico* Analyse

2.2.1.1 Auswahl und Annotation der Kandidatengene

Die Auswahl der Kandidatengene erfolgte aufgrund von positionellen als auch funktionalen Aspekten. Ausgehend von den Ergebnissen der Assoziationsstudien und anschließender Autozygotiekartierung wurden Gene zur weiteren Analyse ausgewählt, die sich innerhalb der identifizierten homozygoten Regionen befanden und für die ein funktionaler Zusammenhang mit den zu untersuchenden Erkrankungen hergestellt werden konnte. Weiterhin wurden zwei Gene untersucht, die in der Literatur als kausal für BHZD (YUZBASİYAN-GURKAN und BARTLETT 2006) bzw. HTS (BOUDREAUX *et al.* 2007b) beschrieben wurden.

Zur Vorhersage der genomischen Struktur und Lokalisation der Kandidatengene, basierend auf der University of Maryland UMD 3.1 Assembly des bovinen Genoms (ZIMIN *et al.* 2009; FLOREA *et al.* 2011) und dem bovinen Genindex (Dana-Faber Cancer Institute, 12,0) (QUACKENBUSH *et al.* 2001), wurde die *GenomeThreader* Software verwendet (GREMME *et al.* 2005). Die Vorhersage erfolgte über den Abgleich der cDNA- und EST-Sequenzen von Mensch, Maus, Ratte, Hund, Schwein und Rind. Die erhaltene *GenomeThreader*-Datei wurde in eine .xml-Datei konvertiert und zur Visualisierung und Bearbeitung in *Apollo Annotation and Curation Tool v.6.1* (LEWIS *et al.* 2002) eingelesen.

Die Bestimmung der Exon-Intron-Positionen der annotierten Gene auf dem UMD3.1-Assembly erfolgte mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Suche. Hierfür wurde *Basic BLAST* von NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL *et al.* 1990) sowie *MegaBLAST Bos taurus* des Centers of Bioinformatics & Computational Biology (CBCB) (<http://blast.cbcb.umd.edu/megablast.html>) verwendet.

2.2.1.2 Genomische Charakterisierung von Kandidatengen

Für alle untersuchten Kandidatengene wurde eine genomische Charakterisierung vorgenommen. Die Überprüfung der Konservierung der Proteinsequenzen der analysierten Gene wurde unter Verwendung von *CLUSTALW v. 2.1* (LARKIN *et al.* 2007) durchgeführt und mit *Jalview2* dargestellt (WATERHOUSE *et al.* 2009). Dabei wurde die bovine Sequenz mit der humanen sowie mit

anderen verfügbaren Spezies verglichen. Hierzu wurden die entsprechenden Sequenzen aus den NCBI-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sowie die bovinen Sequenzen, erhalten aus der *GenomeThreader*-Annotation (siehe Kapitel 2.2.1.1), verwendet.

Die Sequenzidentität sowie die Sequenzähnlichkeit wurde über den paarweisen Vergleich mit Hilfe des Alignment-Programms des European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) unter Anwendung des Needleman-Wunsch-Algorithmus festgestellt.

Die Struktur und Lage der Proteindomänen wurde basierend auf den Informationen der UniProtKB-Datenbank ermittelt (<http://www.uniprot.org/>) (THE UNIPROT CONSORTIUM 2011).

Der wahrscheinliche Promotor und Transkriptionsstart der analysierten Gene wurde mit der *Neural Network Promoter Prediction*-Software des Berkeley Drosophila Genome Project vorhergesagt (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) (REESE 2001). Die dem Programm zugrunde liegenden Algorithmen ermöglichen die Lokalisation eukaryotischer Kernpromotorregionen. Dazu wurden bis zu 1 kb, die vor dem ersten Translationsstart lagen, verwendet. Die Standardeinstellungen des Programms wurden nicht verändert. Die erzielten Ergebnisse wurden mit der *GenomeThreader* Annotation verglichen.

Die 5'-untranslatierte Region (UTR) enthält einige regulatorische Elemente, die für die Genexpression von Bedeutung sind. Zur Identifizierung möglicher CAAT-Boxen wurde *ConSite* (<http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite/>) (SANDELIN *et al.* 2004) verwendet. Die Vorhersage möglicher TATA-Boxen erfolgte sowohl mit *ConSite* als auch mit *HCtata* von *WEBGENE* (<http://www.itb.cnr.it/sun/webgene/>). Erhaltene Ergebnisse der beiden Programme wurden verglichen.

CpG-Inseln wurden mit dem *EMBOSS CpGplot* Programm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>) (RICE *et al.* 2000) visualisiert.

Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) wurden mit *ConSite* vorhergesagt. Dazu wurden die 5'-Bereiche der bovinen und der humanen Gene aligniert und hinsichtlich ihrer Konservierung miteinander verglichen. TFBS wurden nur in Sequenzbereichen mit einem Konservierungsgrad ≥ 80 % hervorgesagt. Alle *in silico* Analysen des 5'-Bereichs wurden mit einem 1 kb langen Sequenzbereich upstream des Translationsstarts durchgeführt.

Zur Detektion des Poly-A-Signals im 3'-Bereich der Gene wurde die *HCpolya*- Software von *WEBGENE* (s.o.) verwendet.

2.2.1.3 Sequenz- und Polymorphismen-Analyse

DNA-Polymorphismen wurden durch den Vergleich der re-sequenzierten Tiere detektiert. Dazu wurden die Chromatogramme der Sequenzen unter Verwendung der *Phred/Phrap/Polyphred*-Software (NICKERSON *et al.* 1997; EWING und GREEN 1998; EWING *et al.* 1998) analysiert und mit *Consed* visualisiert (GORDON *et al.* 1998). Die gefundenen Polymorphismen wurden in eine Datenbank geladen und erhielten eine interne SNP-Nummer (SNP_Id). Zusätzlich wurden die SNPs an die SNP-Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) weitergeleitet und unter einer Identifikationsnummer öffentlich zugänglich gemacht.

Die Visualisierung einzelner Chromatogramme erfolgte unter Verwendung von *4Peaks* (<http://nucleobytes.com/index.php/>).

Die Visualisierung der Daten der genomweiten Re-Sequenzierung erfolgte mittels des „integrative genomic viewer“ (IGV) (<http://www.broadinstitute.org/igv/>) (ROBINSON *et al.* 2011; THORVALDSDÓTTIR *et al.* 2013).

Der Effekt nicht-synonymer Polymorphismen auf die Proteinstruktur wurde mit Hilfe von *SIFT* (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) (NG und HENIKOFF 2001) und *PolyPhen-2* v. 2.2.2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) ermittelt (ADZHUBEI *et al.* 2010).

2.2.2 Isolierung und Evaluierung genomischer DNA

Als Ausgangsmaterialien standen gerinnungsgehemmtes (1,6 mg EDTA/ 1 ml Blut) Vollblut, Sperma sowie Haarwurzeln zur Verfügung. Die Isolierung genomischer DNA erfolgte je nach eingesetztem Material nach verschiedenen Methoden.

2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Sperma

Die Isolierung hochmolekularer DNA aus Spermien erfolgte nach einem veränderten Extraktions- und Ausfällungsprotokoll von LIEN *et al.* (1990). Die Spermaproben wurden bis zur Bearbeitung bei -20°C gelagert. Zur Trennung der Spermien von den enthaltenden Zusätzen wurde je eine Spermaportion mit 1x PBS (50 mM Phosphat-gepufferte Salzlösung, 150 mM NaCl, pH 7,2) in ein Reaktionsgefäß überführt und das Gemisch zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in dem verbleibenden Tropfen resuspendiert. Nach dem zweimaligen Waschen des Spermienpellets mit 1x PBS erfolgte die Zellyse unter Zugabe von Proteinase K (20 mg/ml), DTT (1 M) und 1x PKS-Puffer (10 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS) und Inkubation bei 56°C über Nacht. Für die Reinigung der DNA von den hydrophoben Zellbestandteilen wurde dem Lyseansatz ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugeführt, das Gemisch invertiert und anschließend zentrifugiert. Die DNA-haltige Phase wurde, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, gemischt und zentrifugiert. Für die anschließende Präzipitation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen NaAcetat (3 M, pH 7,6) sowie 1 Volumen Isopropanol (100 %) versetzt, invertiert und zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Um letzte Ethanolreste zu eliminieren wurde das DNA-Pellet 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eluiert. Die DNA-Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Von einigen Bullen lag bereits extrahierte DNA aus früheren Arbeiten (SEEFRIED 2008) sowie aus dem FUGATO-plus Projekt *GenoTrack* (FKZ 0315134) am Lehrstuhl für Tierzucht vor.

2.2.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Blut

Zur Isolierung hochmolekularer DNA aus Blut standen gerinnungsgehemmte (1,6 mg EDTA/ 1 ml Blut) Vollblutproben zur Verfügung. Für die Hämolyse wurden 10 ml Vollblut in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit H₂O_{bidest} und NaCl (1,8 %) gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Kernlyse erfolgte durch die Resuspendierung des Pellets in NP40 (0,1 %). Nach der Zentrifugation wurden zur Proteinlyse 1x PK-Puffer (20 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 100 mM NaCl), SDS (10 %) und Proteinase K (20 mg/ml) zum Pellet hinzugefügt, gemischt und über Nacht bei 56°C und moderatem Schütteln inkubiert. Das Aussalzen der DNA wurde durch die Zugabe von NaCl (5 M) und anschließender Zentrifugation erreicht. Der Überstand wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch die Zugabe von 1 Volumen Isopropanol (100 %) präzipitiert. Das anschließende Waschen der DNA erfolgte durch die wiederholte Zugabe von 70 %igem Ethanol. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die DNA in 1x TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eluiert und die DNA-Lösung bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

2.2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Haaren

Die Isolierung genomischer DNA von einem Tier musste, aufgrund eines vorliegenden Blutchimärismus, aus Haarwurzeln erfolgen. Dazu wurden 20-30 Haare mit Wurzeln mit dem *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen®, Hilden, Deutschland) unter Verwendung des Herstellerprotokolls bearbeitet. Um eine Inhibierung nachfolgender Reaktion durch Phäomelanin auszuschließen wurden die Wurzeln weißer Haare verwendet.

2.2.2.4 Qualitätskontrolle und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Qualität der isolierten genomischen DNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Das Sichtbarmachen der aufgetrennten Fragmente erfolgte durch die Zugabe von Ethidiumbromid. Die DNA wurde mit 3x Mass Ruler Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt und auf ein 0,8 %iges Agarosegel (0,001 % Ethidiumbromid, 0,5 % Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)) aufgetragen. Als Marker wurde lamda n.c. DNA (50 ng; SD0011, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Nach einer Laufzeit

von ca. 60 Minuten bei 50 mV in 0,5x TBE-Puffer erfolgte die digitale Dokumentation der Bande unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm. DNA-Proben mit einer Bande größer als 23.130 bp wurden als hochmolekular angesehen und die DNA-Isolierung als erfolgreich eingestuft. Degradierete DNA-Proben wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die Quantifizierung und eine zusätzliche Qualitätskontrolle der isolierten genomischen DNA erfolgte unter Verwendung des NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Der 260/280-Wert sollte einen optimalen Wert zwischen 1,8 und 2,0 haben, der 260/230-Wert sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Abweichungen von diesen Werten wurden als Hinweis auf Verunreinigungen der DNA-Lösungen gedeutet. Weiterhin wurde die Menge der in den Lösungen enthaltenen Nucleinsäuren bestimmt.

Die DNA-Konzentrationen der Arbeitslösungen wurden für die Amplifikation mittels PCR auf 10 ng/μl, für die Genotypisierung auf 60 ng/μl eingestellt.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.3.1 Primerdesign

Das Design der Primer erfolgte unter Verwendung der *Primer3* Software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (ROZEN und SKALETSKY 2000) basierend auf der Sequenzinformation des bovinen UMD3.1-Assemblys (ZIMIN *et al.* 2009; FLOREA *et al.* 2011). Die Schmelztemperatur eines Primers sollte zwischen 57°C und 63°C liegen, mit einer optimalen Temperatur von 60°C. Der optimale GC-Gehalt der Primer sollte bei 50 %, die optimale Länge bei 20 Nucleotiden liegen. Weiterhin sollten nicht mehr als drei identische Basen innerhalb eines Primers aufeinander folgen. Die Standardeinstellungen für Primerrückfaltungen und Primerdimerisierung wurden übernommen. Die Länge der amplifizierten Produkte sollte im Bereich zwischen 500 und 750 Basen liegen. Alle Primer wurden auf ihre Funktionalität und Spezifität getestet. Die Synthese der Oligonucleotide erfolgte durch die Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). Um eine 100 μM-Lösung zu erstellen, wurden die lyophilisierten Primer zunächst in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) eluiert. Aus den Stammlösungen wurden Arbeitslösungen (5 μM) durch Verdünnung mit Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) erstellt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9.1 im Anhang aufgeführt.

2.2.3.2 Standard-PCR

Eine PCR unter Standardbedingungen wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und enthielt 10 ng genomische DNA, 1x Coral Load PCR Puffer (inklusive 1,5 mM MgCl₂; Qiagen, Hilden, Deutschland), 200 µM dNTP-Mix (desoxy-Nukleosidtriphosphat) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,25 µM jedes Primers und 1 U Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung eines T-Gradient Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) unter den folgenden Bedingungen: initiale Denaturierung bei 94°C für 4 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung bei 94°C für 40 Sekunden, Annealing bei 60°C für 1 Minute, Elongation bei 72°C für 1 Minute und eine abschließende Elongation bei 72°C für 4 Minuten. Der Amplifikationserfolg der durchgeführten PCR wurde im Anschluss mittels Elektrophorese auf einem 1.5 %igen Gel (0,001 % Ethidiumbromid, 0,5x TBE-Puffer) überprüft. Die PCR-Produkte wurden zusammen mit GeneRuler™100 bp-DNA-Ladder® (Thermo Fisher Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland) für ca. 30 Minuten bei 100 mV in 0.5x TBE-Puffer aufgetrennt und unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht.

2.2.3.3 PCR-Optimierung

Alle Primersysteme wurden mit einem bovinen DNA-Pool unter Standardbedingungen getestet. Falls notwendig, wurde dem Standardansatz Q-Solution (finale Konzentration 1x, Qiagen, Hilden, Deutschland) oder DMSO (Dimethylsulfoxid) (finale Konzentration 5 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugefügt. Weiterhin wurden die Primersysteme, mit und ohne zusätzliche Reagenzien, in einem zwölfschrittigen Temperaturgradienten (54° - 64°C) auf ihre Funktionalität getestet. Bei schwachen Amplifikationsprodukten wurde die Zyklenzahl auf 35 erhöht. Im weiteren Verlauf wurden die PCR-Bedingungen mit den besten Resultaten verwendet. Fragmente, die einen hohen Cytosin-Guanin-Anteil aufweisen, wurden alternativ mit der AccuPrime™ GC-rich DNA-Polymerase (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) amplifiziert. Der verwendete Ansatz bestand aus 1x Puffer A, 2 mM MgSO₄, je 0,25 µM jeden Primers, 0,6 U Polymerase und 10 ng genomischer DNA.

2.2.3.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Vor der weiteren Verwendung der PCR-Produkte für nachfolgende Reaktionen wurde der Ansatz von nicht-eingebauten dNTPs, Primern und einzelsträngigen DNA-Fragmenten gesäubert. Die Aufreinigung erfolgte enzymatisch. Dazu wurden 2 U Exonuklease I (Thermo Fisher Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland) und 0,4 U FastAP (Thermo Fisher Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland) mit dem PCR-Ansatz vermischt. Es wurde ein Reaktionsvolumen von 8 µl verwendet. Das Gemisch wurde in einem UNO-Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Eine anschließende Inaktivierung der Enzyme wurde bei 80°C für 15 Minuten durchgeführt. Die Lagerung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte bei -20°C.

2.2.4 DNA-Re-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierreaktion wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (SANGER *et al.* 1977) mit fluoreszenzmarkierten 3'-5'-Dideoxy-Nukleotiden (ddNTPs) durchgeführt. Alle Sequenzierreaktionen wurden mit dem Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Das Volumen der Sequenzierreaktion betrug 10 µl und enthielt das aufgereinigte PCR-Produkt, 0,25 µM forward oder reverse Primer, 1x Big Dye Sequenzierpuffer (Big Dye Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), 1x Dilution-Puffer (5 mM MgCl₂, 0,2 mM Tris-HCl pH 8,0) und 1x BigDye® Terminator v1.1. Die Amplifizierung erfolgte im T-Thermocycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) nach folgendem Programm: Initiale Denaturierung bei 95°C für 20 Sekunden, 25 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 12 Sekunden, Annealing bei 51°C für 8 Sekunden und Elongation bei 60°C für 4 Minuten.

2.2.4.1 Aufreinigung und Kapillarelektrophorese auf ABI 3130XL

Die Sequenzierreaktion wurde mit Hilfe von Sephadex-G50 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) aufgereinigt. Hierfür wurden MultiScreen HV Filtrationsplatten (MAHVN4510; Millipore S.A., Moisheim, France) mit 45 ng Sephadex-G50 befüllt, nach Zugabe von 300 µl H₂O_{bidest} für 2 Stunden bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Aufquellen inkubiert und im Anschluss zentrifugiert. Die Sequenzierreaktion wurde mit 15 µl EDTA-H₂O (0,1 mM) versetzt und mittig auf die jeweilige Position aufgetragen. Durch die anschließende Zentrifugation wurde die Sequenzierreaktion von nicht-eingebauten Nukleotiden befreit.

Die Sequenzierung der Produkte erfolgte durch eine Kapillargelelektrophorese im 3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) unter Verwendung des 3130 POP-7-Polymers und einer 36 cm 3130xl & 3100 Kapillare unter Standardeinstellungen. Zur qualitativen Datenbeurteilung und Zuordnung der Nukleotide wurde die ABI Sequencing Analysis Software v.5.2 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. DNA-Polymorphismen wurden über den multiplen Vergleich re-sequenzierter Tiere unter Verwendung der *Phred/Phrap/Polyphred*-Software detektiert und mit *Consed* visualisiert (siehe Kapitel 2.2.1.3).

2.2.5 Genotypisierung

2.2.5.1 TaqMan[®]-Genotypisierung

Die Genotypisierung des durch die genomweite Re-Sequenzierung identifizierten *PLD4*-Polymorphismus (c.G645A, p.W215X) sowie der *RasGRP2*-Variante (c.T911C, p.L234P) erfolgte unter Verwendung des ABI 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Die Erstellung des Assays erfolgte durch Life Technologies (Darmstadt, Deutschland). Zur Genotypisierung wurde ein 5'-Nuklease Assay mit Polymorphismen-spezifischen PCR-Primern und TaqMan[®]-Sonden erstellt (Tabelle 2.1). Der Versuchsansatz setzte sich aus dem SNP-spezifischen Assay, dem TaqMan[®]-Genotypisierungs-Master Mix (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und 2 ng DNA zusammen. Nach einem Pre-Read bei 60°C für 1 min und einer initialen Denaturierung bei 95°C für 10 min, folgten in 40 Zyklen wiederholte Denaturierungsschritte bei 92°C für 15 sec und kombinierte Annealing-Elongationsschritte bei 60°C für 1 min. Anschließend wurde im Post-Read (60°C für 1 min) die Fluoreszenz gemessen. Die Bestimmung der Genotypen erfolgte über die 7500 Software v2.0.5 mit einem Schwellenwert für die Qualität der Amplifikation von > 95. Insgesamt wurden drei verschiedene Rassen (Fleckvieh, Holstein-Friesian und Braunvieh) an den identifizierten Varianten genotypisiert.

Tabelle 2.1: Primersequenzen der TaqMan[®]-Genotypisierung der *PLD4*- und *RasGRP2*-Varianten

<i>Polymorphismen</i>	<i>c.G645A (p.W215X)</i>	<i>c.T911C (p.L234P)</i>
<i>forward Primer</i>	GGGCGGCACATCTACGT	CCTCCTCTCTCCCCATTTGTC
<i>reverse Primer</i>	CCAGGGCGGACGAACTC	GCCATCAGCGTGTGAAATTCTG
<i>Sonde für Wildtyp - Allel</i>	CATGGACTGGCGGTCC	CCCAGGAAC T CCTGCAC
<i>Sonde für mutiertes Allel</i>	CATGGACTGACGGTCC	CCCAGGAACC C CCTGCAC

*PCR-Primer und Genotypisierungs-Sonden für den *PLD4*-Polymorphismus (c.G645A, p.W215X) und den *RasGRP2*-Polymorphismus (c.T911C, p.L234P). Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung dargestellt.*

2.2.5.2 Genomweite Genotypisierung und Qualitätskontrolle

Die Durchführung der Genotypisierung erfolgte an der iScan-Genotypisierungsplattform (Illumina, San Diego, USA) nach den Protokollen des Herstellers.

Zur Untersuchung der mutmaßlichen Zinkmalabsorptionsstörung wurden alle acht betroffenen Kälber sowie 1339 nicht betroffene Fleckvieh-Bullen mit dem bovinen HD BeadChip an 777.962 SNPs genotypisiert. Die Bestimmung der Genotypen erfolgte mit Hilfe der *BeadStudio* Software von Illumina (Illumina, San Diego, USA) nach Standardeinstellungen. Die chromosomale Position der Polymorphismen wurde basierend auf dem UMD3.1-Assembly des bovinen Genoms bestimmt (ZIMIN *et al.* 2009; FLOREA *et al.* 2011). 343 mitochondriale SNPs, 1224 Y-chromosomale und 1735 SNPs mit unbekannter chromosomaler Position wurden für die weiteren Analysen nicht berücksichtigt. Die Qualitätskontrolle erfolgte unter Verwendung von *PLINK v1.07* (PURCELL *et al.* 2007). Weiterhin wurden 19.734 SNPs, deren Genotypisierung in mehr als 5 % der Individuen fehlgeschlagen ist und 110.746 SNPs mit einer Allelfrequenz $< 0,5$ % in den nachfolgenden Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt. Vereinzelt fehlende SNPs des selteneren Allels wurden mit *Beagle* (BROWNING und BROWNING 2009) imputiert. Der finale Datensatz bestand aus 1347 Tieren und 644.450 SNPs.

Zur Analyse der bovinen Thrombozytopathie wurden insgesamt 46 TCP-Tiere (32 Fälle und 14 mit fehlender oder uneindeutiger Impedanzmessung) und 3307 nicht betroffene Fleckvieh-Bullen mit dem bovinen HD BeadChip an 777.962 SNPs genotypisiert. Das Bestimmen der Genotypen erfolgte unter Verwendung der *BeadStudio* Software von Illumina (Illumina, San Diego, USA). Es wurden insgesamt 3301 mitochondriale, nicht annotierte und Y-chromosomale SNPs von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Qualitätskontrolle wurde mittels *PLINK v1.07* (PURCELL *et al.* 2007) durchgeführt. 2 Tiere der Kontrollgruppe wurden aufgrund einer Genotypisierungsrate von weniger als 95 % in der weiteren Untersuchung nicht berücksichtigt. Weiterhin wurden 20.627 SNPs für die nachfolgende Analyse außer Acht gelassen, da ihre Genotypisierung in mehr als 5 % der Tiere fehlgeschlagen ist sowie 93.216 SNPs mit einer Allelfrequenz des selteneren Allels < 1 %. Der finale Datensatz setzte sich aus 3351 Tieren (46 TCP-Tiere und 3305 Kontrolltiere) und 660.817 SNPs zusammen.

2.2.5.3 Genomweite Assoziationsstudie

Zur Berücksichtigung der Populationsstratifikation und der daraus resultierenden Inflation falsch-positiver Signale wurde die Assoziationsstudie unter Verwendung eines gemischten Modells durchgeführt. Die Anpassung des linearen gemischten Modells $y = \mu + x\beta + Zu + \epsilon$ wurde mit der Software *GEMMA* durchgeführt (ZHOU und STEPHENS 2012). Hierbei steht y für den Krankheitszustand, μ ist das Interzept, x ist ein Vektor der Marker-Genotypen, β ist der SNP-Effekt, Z ist die Inzidenzmatrix zur Zuordnung von Tieren und u , der Vektor des zufälligen polygenen Effekts $\sim N(0, \sigma_a^2 G)$, wobei σ_a^2 die additive genetische Varianz, G die genomische Verwandtschaftsmatrix der genotypisierten Tiere basierend auf den autosomalen SNPs (nach (VANRADEN 2008)) und ϵ der Vektor der zufälligen Restfehler ist.

2.2.5.4 Haplotypenanalyse

Die Haplotypen der genotypisierten Tiere wurden unter Verwendung der Standardeinstellungen der Software *Beagle* abgeleitet (BROWNING und BROWNING 2009). Zur Schätzung der Frequenz des assoziierten Haplotyps in der FV-Population wurden die Genotypen von insgesamt 9016 nicht-betroffene Tieren (BHZD-ähnliches Syndrom) bzw. 10.363 nicht-betroffenen Tieren (TCP) analysiert. Hochdichte Genotypen und Haplotypen des 54k-Datensatzes wurden basierend auf den Haplotypen des 777k-Datensatzes imputiert (nach (PAUSCH *et al.* 2013)).

2.2.6 Genomweite Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse

Die genomweite Re-Sequenzierung der beiden betroffenen Tiere (BHZD-ähnliches Syndrom und TCP) sowie 42 einflussreichen Gründer-Tiere der Rasse FV erfolgte mit einer geringen bis mittleren Abdeckung (durchschnittlich 7,4fach) unter Verwendung des Illumina HiSeq 2000 und der Illumina GA Iix Technologie (Illumina, San Diego, USA) (JANSEN *et al.* 2013). Unter den 42 FV-Tieren befand sich auch ein Bulle, der den assoziierten Haplotypen des BHZD-ähnliches Syndroms ebenfalls homozygot trägt ohne erkrankt zu sein. Insgesamt konnten Genotypen für 17,3 Millionen variable Positionen identifiziert werden. Varianten in den assoziierten, homozygoten Sequenzregionen wurden systematisch nach Genotypenmustern, die den vermuteten rezessiven Erbgängen entsprechen durchsucht.

3 Ergebnisse

3.1 BHZD-ähnliches Syndrom

3.1.1 Phänotypische Manifestation

Im Zeitraum vom Sommer 2009 bis Anfang 2012 wurden sieben Kälber im Alter von sieben bis 17 Wochen mit auffälligen Hautveränderungen und einem schlechten Allgemeinzustand in die Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität München eingewiesen und dort von Veterinärmedizinerinnen eingehend untersucht. Die betroffenen Fleckvieh-Kälber wiesen einen sehr schlechten Allgemeinzustand (Abbildung 4.1 A) und eine hochgradig hyperkeratotische und stark rissige Haut auf. Diese war in besonderem Maße im Bereich der Augen, des Mauls (Abbildung 4.1 B), an den Extremitäten und der sternalen Region ausgeprägt und zum Teil stark verkrustet (Abbildung 4.1 C) oder alopetisch (Abbildung 4.1 D). Zusätzlich litten die Tiere unter ausgeprägten, erosiven und eiternden Läsionen der Mundschleimhaut. Alle Kälber waren in Größe und Gewicht unterentwickelt, zeigten kein selbstständiges Abliegeverhalten und waren verstärkt berührungsempfindlich. Die Anamnese der sieben Tiere zeigte das vermehrte Auftreten von Erkrankungen des Lungenapparats und des Darmtrakts (Pneumonie und Enteritis). Zwei Kälber wurden mit hochdosierten Zinkpräparaten behandelt, sprachen aber auf die Behandlung nicht an. Aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums der Erkrankung und ohne Aussicht auf eine Besserung der Symptomatik wurden alle Kälber euthanasiert und pathologisch untersucht. Zusätzlich wurde der Fall eines elf Wochen alten weiblichen FV-Kalbs mit starken Hautveränderungen und einem schlechten Allgemeinzustand von einem weiteren Tierarzt vorgestellt. Bereitgestellte Fotos zeigten eine Übereinstimmung des Phänotyps mit den sieben untersuchten Kälbern. Das Kalb erhielt über einen Zeitraum von zwei Wochen hochdosiertes Zink, sprach aber auf die Behandlung nicht an, so dass es im Alter von 13 Wochen euthanasiert wurde.

Bei einer ersten Stammbaumanalyse der acht betroffenen Kälber konnte ein gemeinsamer Vorfahre ermittelt werden, so dass ein genetischer Hintergrund der Erkrankung wahrscheinlich war. Auf der Basis der Krankheitsgeschichte, klinischer und pathologischer Untersuchungsergebnisse wurde die vorläufige Diagnose „bovine hereditäre Zinkdefizienz (BHZD)“ getroffen.

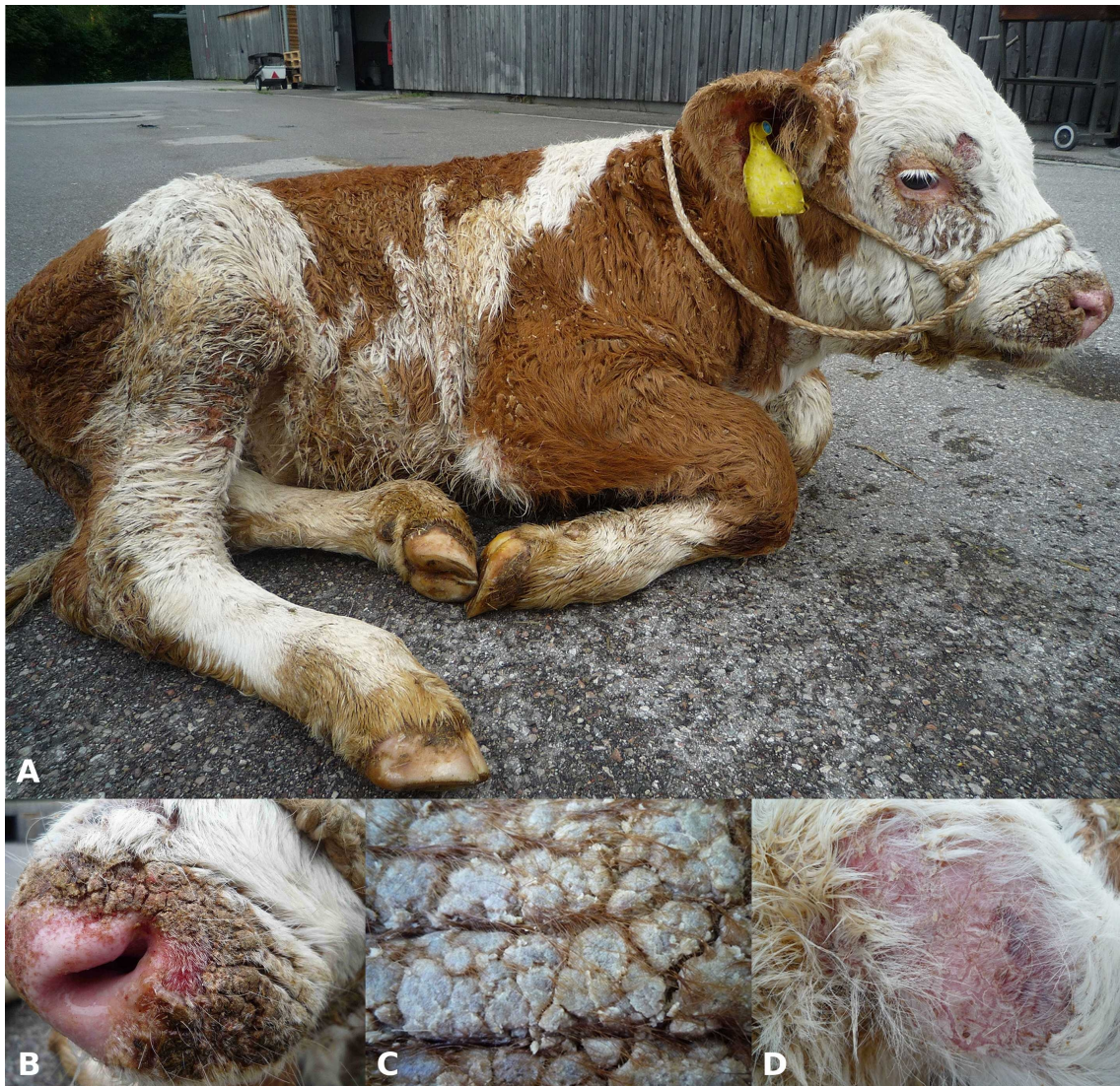


Abbildung 3.1: Krankheitssymptomatik des BHZD-ähnlichen Syndroms beim Fleckvieh

Fotos: Dr. med. vet. Nicole Gollnick

FV-Kalb mit A) schlechtem Allgemeinzustand und parakeratotischen Hautveränderungen an mechanisch exponierten Stellen B) starken Verkrustungen und parakeratotischen Hautveränderungen am Flotzmaul und C) stark rissiger und verkrusteter, zum Teil D) alopetischer Haut

3.1.2 Analyse des *SLC39A4*-Gens

Die SLC39A (solute carrier 39A)-Proteinfamilie, auch ZIP-(Zrt- and Irt-like protein) genannt, besteht aus 14 Mitgliedern, welche die Aufnahme von Zink in das Zytoplasma regulieren (ANDREWS 2008). Sie erhöhen den intrazellulären Zinkgehalt durch aktiven Transport des Zinkions und anderer zweiwertiger Ionen in das Zytoplasma (LIUZZI und COUSINS 2004). Unter den Zink-Transportern nimmt ZIP4 eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zinkhaushaltes ein (GUERINOT 2000; ANDREWS 2008). Mutationen in dem Transporter-kodierenden Gen, *SLC39A4*, verursachen bei verschiedenen Spezies eine erbliche Störung der Zinkaufnahme (KÜRY *et al.* 2002; DUFNER-BEATTIE *et al.* 2003; WANG *et al.* 2004; YUZBASIYAN-GURKAN und BARTLETT 2006). *SLC39A4* wird hauptsächlich in Gastrointestinaltrakt exprimiert und ist für die Absorption von Zink aus der Nahrung verantwortlich. Zusätzlich kommt der Transporter auch in den Nieren vor, wo er an der Zinkresorption aus dem Urin beteiligt ist (EIDE 2004; ANDREWS 2008).

Da Mutationen in dem kodierenden Gen als ursächlich für erbliche Zinkmangelkrankungen bei Menschen, Mäusen und Rindern der Rasse Holstein-Friesian identifiziert wurden (s.o.), wurde *SLC39A4* als Kandidatengen für den FV-spezifische Erkrankung in Betracht gezogen und analysiert.

Mittels einer BLAST-Suche konnte das bovine *SLC39A4* auf Chromosom 14 (1.719.732 bp – 1.724.221 bp) lokalisiert werden. Basierend auf der *GenomeThreader*-Annotation wurde das ~ 4,5 kb große Gen in zwölf Exons unterteilt (Abbildung 3.2), die ein Transkript aus insgesamt 2162 bp kodieren.

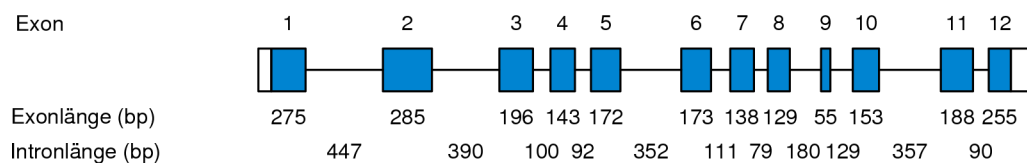


Abbildung 3.2: Graphische Darstellung der Genstruktur von *SLC39A4*

Kodierende Sequenzbereiche sind blau, untranslatierte Regionen weiß und intronische Bereiche durch schwarze Balken dargestellt. Zusätzlich ist die Exon- und Intronlänge basierend auf UMD3.1-Assembly-Informationen in Basenpaaren (bp) angegeben.

Das entsprechende Protein hat einen Translationslänge von 653 Aminosäuren. Sowohl in dem bovinen als auch im humanen Transkript befindet sich der Translationsstart im ersten Exon und

der Translationsstopp im letzten Exon des Gens. Der menschliche Transporter besitzt zwei Isoformen, die sich im 5'-terminalen Bereich unterscheiden und aus 647 bzw. 622 Aminosäuren bestehen (ANTALA und DEMPSKI 2012). Die Anordnung der Transmembrandomänen (TM) im Rind ist mit der menschlichen Organisation der Proteindomänen vergleichbar. Transmembrandomäne 1 und 2 werden im sechsten Exon kodiert, TM 3 liegt im siebten Exon. Die Proteindomänen 4-8 (TM 4-8) werden in Bereichen der zehnten, elften und zwölften Exons kodiert. Die detaillierte Intron-Exon-Organisation des Gens mit Positionsangaben im UMD3.1-Assembly wird in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Intron-Exon-Organisation des SLC39A4-Gens in UMD3.1

Nr.	Exon- länge (bp)	Position in cDNA	Position BTA14 ^{b)}	3' Spleißakzeptor ... 5' Spleißdonor ^{a)}	Nr.	Intron- länge (bp)
1 ^{c)}	275	1 - 275	1.719.732 – 1.720.006	catcaGGCAG ... GAAAGgtaac	1	447
2	285	276 - 560	1.720.454 – 1.720.738	aacagTGCCT ... AGCAGgtggg	2	390
3	196	561 - 756	1.721.129 – 1.721.324	cccagGCCTG ... GGACGgtgag	3	100
4	143	757 - 899	1.721.425 – 1.721.567	gccagAGCTG ... ACACGgtgag	4	92
5	172	900 – 1071	1.721.660 – 1.721.831	cccagCTGTG ... TGAGAgtgag	5	352
6	173	1072 – 1244	1.722.184 – 1.722.356	accagGGTAC ... CTAAGgttgc	6	111
7	138	1245 - 1382	1.722.468 – 1.722.605	accagGTGCT ... CCGAGgtcag	7	79
8	129	1383 - 1511	1.722.684 – 1.722.813	cgcagGACCC ... ATCTGgtgag	8	180
9	55	1512 - 1566	1.722.994 – 1.723.048	tccagGTGGC ... CCCAGgtgag	9	129
10	153	1567 - 1719	1.723.178 – 1.723.330	cgcagGGCTG ... GCTGGgtgag	10	357
11 ^{d)}	188	1720 - 1907	1.723.688 – 1.723.875	cccagGGGAT ... ACATGgtcag	11	90
12	255	1908 - 2162	1.723.966 – 1.724.220	ctcagCTCCC ... CTTGGagccc		

a) Intronische Bereiche sind durch Kleinbuchstaben, exonische Bereiche durch Großbuchstaben gekennzeichnet, die Spleißseiten sind fett unterlegt; basierend auf GenomeThreader Annotation

b) Position basierend auf *Bos taurus* UMD3.1-Assembly

c) Exon enthält Startcodon

d) Exon enthält Stoppcodon

Die Vorhersage des Transkriptionsstarts mit der *Neural Network Promoter Prediction*-Software war nicht erfolgreich. Daher wurde zur Identifizierung konservierter Promotorsequenzen (z.B. TATA-Box oder CAAT-Box) ein 1 kb langer Bereich upstream des Translationsstarts mit *ConSite* analysiert. Innerhalb der Region konnte eine CAAT-Box 153 bp vor der ersten Base des Startcodons lokalisiert werden (Abbildung 3.3).

CCTTGGCAGCCAATCACAGGGCCCCGCAGGAAATACCTGGAGAGCCTCGCTGG
 GTGAGAGGTACTGGCCCAGCCCCAGTCCGGCATCAGGCAGCCCCTGCGCCCC

Abbildung 3.3: Promotor-Sequenz-Vorhersage des SLC39A4-Gens

Der vorhergesagte Transkriptionsstart ist schwarz markiert, promotorspezifische Elemente sind grau umrandet.

Im Allgemeinen können Säugetier-Promotoren in zwei Klassen unterteilt werden, die TATA-Box- und die CpG-reichen Promotoren (CARNINCI *et al.* 2006). CpG-reiche Promotoren zeichnen sich durch unmethylierte DNA-Bereiche mit, im Vergleich zum ganzen Genom, einem hohen Anteil von CpG-Dinukleotiden, so genannten CpG-Inseln, aus. CpG-Inseln sind als mindestens 200 bp lange Sequenzbereiche mit einem GC-Gehalt $\geq 50\%$ und einer beobachteten/erwarteten CpG-Rate von 0,6 definiert (GARDINER-GARDEN und FROMMER 1987). Diese Eingrenzung wurde von (TAKAI und JONES 2002) überarbeitet, so dass CpG-Inseln als Sequenzbereich von mindesten 500 bp mit einem GC-Gehalt $\geq 55\%$ und einer beobachteten/erwarteten CpG-Rate von 0,65 definiert sind. CpG-Inseln sind in mehr als 2/3 aller Säugetier-Gene enthalten, wohingegen TATA-Boxen nur bei einer Minderheit der Promotoren vorhanden sind (FENOUIL *et al.* 2012).

Zur Evaluierung möglicher CpG-Inseln wurde das 5'-Ende des bovinen SLC39A4-Gens mit *CpGplot* untersucht. Die Suche nach möglichen CpG-Inseln erbrachte keine Resultate.

Für die Suche nach möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) mit *ConSite* wurden 1000 bp upstream des 3'-Endes des ersten Exons der bovinen und menschlichen SLC39A4-Sequenz aligniert und hinsichtlich ihrer Konservierung auf das Vorhandensein von TFBS überprüft. Bei einem Konservierungsgrad von $> 80\%$ konnten keine TFBS entdeckt werden, da die Sequenzidentität zwischen der bovinen und der humanen 5'-Region gering ist.

Die Konservierung der Aminosäuresequenz wurde über ein multiples Sequenzalignment der bovinen mit den beiden menschlichen Isoformen sowie den murinen Proteinsequenzen unter Verwendung von *CLUSTALW* (LARKIN *et al.* 2007) durchgeführt (Abbildung 3.4).

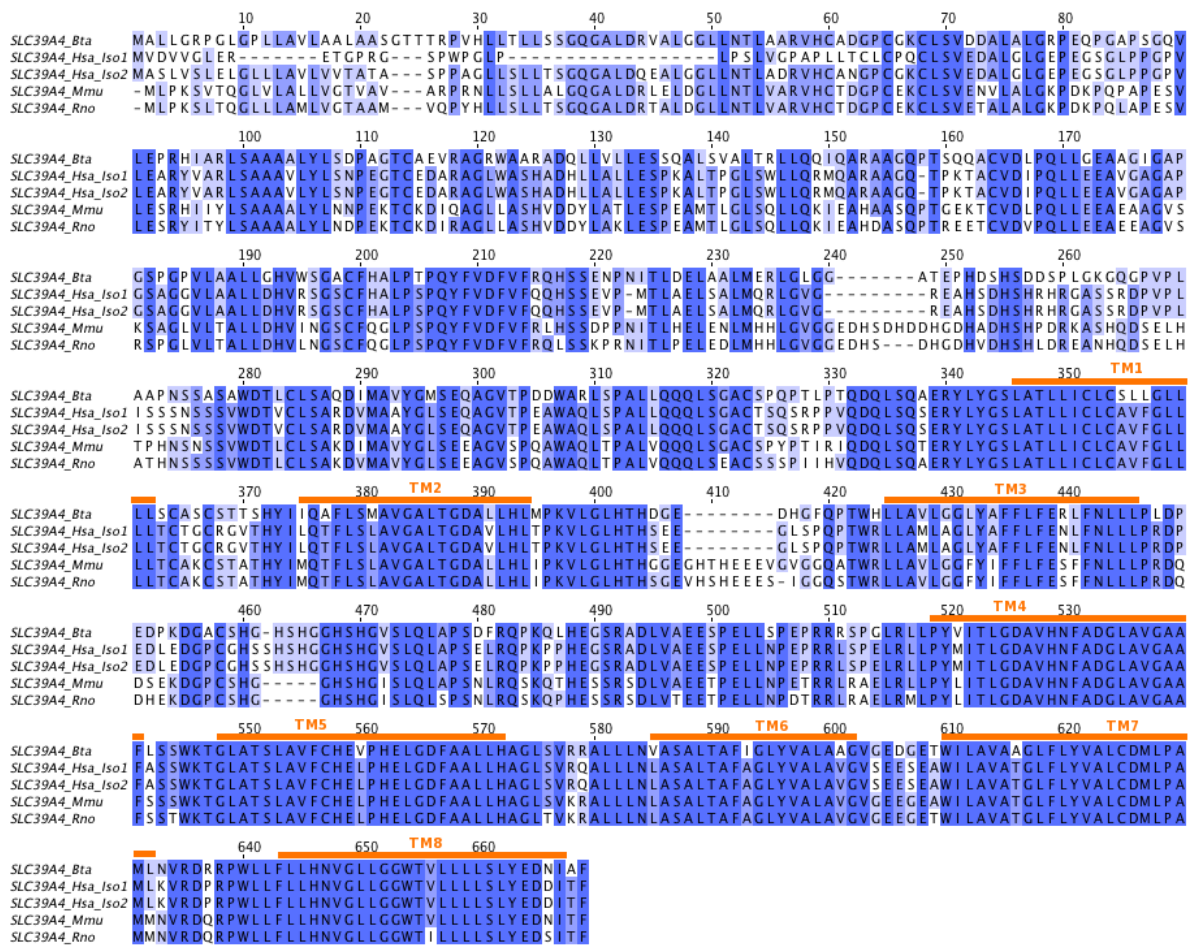


Abbildung 3.4: Multiples Alignment der SLC39A4-Proteinsequenzen verschiedener Spezies

Vergleich der SLC39A4-Proteinsequenzen von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa)-Isoform 1 und 2 (NP_060237, NP_130849), Maus (Mmu, NP_082340) und Ratte (Rno, NP_001071137). Bereiche mit einer Sequenzidentität $\geq 50\%$ sind blau unterlegt. Die Lage der Transmembrandomänen 1-8 (TM 1-8) ist, basierend auf Informationen der UniProtKB-Datenbank, orange gekennzeichnet. Die Skala entspricht der Position der Aminosäure im Alignment. Darstellung des Alignments ohne Kennzeichnung der Domänen mit Jalview2 (WATERHOUSE et al. 2009).

Der ZIP4-Transporter besitzt acht, über Spezies hinweg, hoch konservierte funktionale Transmembrandomänen (TM1-TM8). Der hohe Konservierungsgrad der verschiedenen Domänen spiegelt die Funktionalität dieser Bereiche wieder.

Die Berechnung der Sequenzidentität und -ähnlichkeit erfolgte mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus. Die Analyse der Proteinsequenzen des humanen und des bovinen ZIP4-Proteins erbrachte für den Vergleich der menschlichen Isoform 1 mit dem bovinen Protein eine Sequenzidentität von 67,9 % (Sequenzähnlichkeit 76,8 %) und für den Vergleich der zweiten Isoform mit dem bovinen Transporter eine Sequenzidentität von 74 % (Sequenzähnlichkeit 82,8 %) (Tabelle 3.2). Weiterhin weist das bovine ZIP4-Protein eine 67,1 %ige bzw. 66,8 %ige Sequenzidentität

und eine 76,2 %ige bzw. 76,9 %ige Sequenzähnlichkeit zu den beiden murinen Proteinen (Maus und Ratte) auf. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass der Transporter über verschiedene Spezies hinweg konserviert ist. Dies ist ein Indiz für die wichtige Funktion des Proteins bei der Aufnahme von Zink und anderen zweiwertigen Ionen aus der Nahrung.

Tabelle 3.2: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des SLC39A4-Proteins

<i>Sequenz_1</i>	<i>Sequenz_2</i>	<i>Sequenzidentität (in %)</i>	<i>Sequenzähnlichkeit (in %)</i>	<i>Alignmentlücken (in %)</i>
<i>SLC39A4_Bta</i>	<i>SLC39A4_Hsa_Iso1</i>	67,9	76,8	9,4
<i>SLC39A4_Bta</i>	<i>SLC39A4_Hsa_Iso2</i>	74,0	82,8	2,1
<i>SLC39A4_Bta</i>	<i>SLC39A4_Mmu</i>	67,1	76,2	6,1
<i>SLC39A4_Bta</i>	<i>SLC39A4_Rno</i>	66,8	76,9	6,1

Paarweiser Vergleich der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des SLC39A4-Proteins von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa)-Isoform 1 und 2 (NP_060237, NP_130849), Maus (Mmu, NP_082340) und Ratte (Rno, NP_001071137). Die Berechnung erfolgte mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus (s.o.).

3.1.2.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse

Die Re-Sequenzierung des *SLC39A4*-Gens erfolgte in einem Probenet bestehend aus acht erkrankten Kälbern, 16 Anlageträgern und zwölf Kontrolltieren. Auf der Suche nach Polymorphismen wurden insgesamt ca. 8,2 kb re-sequenziert. Diese umfassen das gesamte *SLC39A4*-Gen sowie je ca. 1000 bp der flankierenden Regionen des 5'- bzw. 3'-Endes dieses Gens. Insgesamt konnten zehn variable Nukleotidpositionen identifiziert werden (Tabelle 3.3). Zwei der entdeckten Polymorphismen waren im 5'-Bereich des Gens lokalisiert, sieben variable Positionen befanden sich in intronischen Regionen des Gens. Ein SNP konnte im sechsten Exon des Gens aufgefunden werden. Dabei handelte es sich um einen synonymen C→T-Polymorphismus (TAC→TAT; p.336Y). Keiner der gefundenen Varianten lag in den betroffenen Kälbern homozygot und gleichzeitig in den Kontrolltieren alternativ-homozygot vor. Dies schließt eine Kausalität dieser Polymorphismen für die zugrunde liegende Erkrankung aus.

Tabelle 3.3: Polymorphismen im SLC39A4-Gen in 36 FV-Tieren

SNP_Id	Position	5'- 3' – flankierende Sequenz	Region	Effekt	AS
3958	1.706.176	CCTCCCTCAG [C/T] GATTCTCTTA	UPSTREAM		
3959	1.718.954	CTCAAGTGTC [C/G] CCTTGTGAAT	UPSTREAM		
3960	1.720.167	ACTCTCCTCA [A/G] CTCCTTTCA	INTRON 1		
3961	1.720.373	TGAGCGAGCC [A/G] AACCGTGGAG	INTRON 1		
3962	1.720.865	GAGCCTGGGC [C/T] GGGGCGGTCA	INTRON 2		
3963	1.720.989	CGGACGAGGC [A/G] GGGCTGGGAG	INTRON 2		
3964	1.721.108	GCTTGAGACA [C/T] TGAGGCCGGC	INTRON 2		
3965	1.721.593	GCCTGAGTCC [C/T] GGAGAGAGGT	INTRON 4		
3966	1.722.194	GGTACCTGTA [C/T] GGCTCCCTGG	EXON 6	SYNONYM	336Y
3967	1.722.853	TCTGGCGGAG [C/T] CCTGTCTGTG	INTRON 8		

Übersicht der durch Re-Sequenzierung identifizierten Polymorphismen des SLC39A4-Gens mit 5'- und 3'-flankierenden Regionen in 36 FV-Rindern. Die SNP_Id entspricht der internen Identifikationsnummer, die Position entspricht der Lokalisation des SNPs auf BTA14 im UMD3.1-Assembly. Die [] enthält die Referenzbase und den identifizierten Polymorphismus (fett). Das Referenz-Allel entspricht der Base der bovinen Referenzsequenz. Der Effekt entspricht der Auswirkung des Austauschs auf die Aminosäuresequenz, AS ist der Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz mit Positionsangabe.

3.1.3 Genomweite Assoziationsstudie

Da die molekulargenetische Untersuchung des *SLC39A4*-Gens in den betroffenen FV-Tieren nicht zur Detektierung einer kausalen Variante geführt hat, wurden ein Array-basierter Ansatz zur Identifizierung der zugrunde liegenden genomischen Region durchgeführt.

Die acht erkrankten Kälber sowie 1339 gesunde Fleckvieh-Bullen wurden mit dem bovinen HD BeadChip von Illumina genotypisiert und eine genomweite Assoziationsstudie des Krankheitsstatus für 644.450 SNPs unter Verwendung eines linearen gemischten Modells durchgeführt. Insgesamt erfüllten 82 SNPs, welche sich innerhalb eines 18,19 Mb Intervalls von 53.140.245 bp bis 71.333.740 bp auf Chromosom 21 befinden, den Bonferroni-korrigierten Schwellenwert für genomweite Signifikanz ($P < 7,88 \times 10^{-8}$) (Abbildung 3.5). Die stärkste Assoziation ($P = 5,87 \times 10^{-89}$) wurde für *BovineHD4100015383*, lokalisiert bei 69.873.257 bp, beobachtet. Für die *SLC39A4*-beinhaltende Region auf Chromosom 14 konnte keine Assoziation mit dem Krankheitsstatus beobachtet werden.

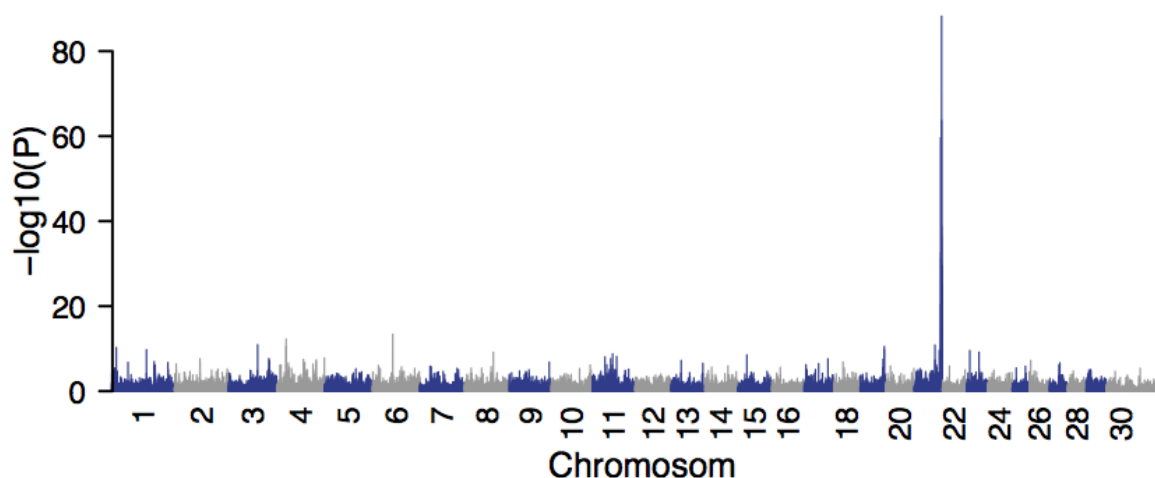


Abbildung 3.5: Assoziation von 644.450 SNPs mit dem Krankheitsstatus acht betroffener und 1339 nicht-betroffener FV-Tiere

Die genomweite Assoziationsstudie für 644.450 SNPs mit dem Krankheitsstatus von acht erkrankten Kälbern und 1339 Kontrolltieren konnte eine starke Assoziation ($P = 5,87 \times 10^{-89}$) auf BTA 21 feststellen. Die P-Werte wurden mittels eines linearen gemischten Modells ermittelt. Die physikalische Position nach dem UMD3.1 Assembly ist auf der x-Achse, der negative dekadische Logarithmus der P-Werte auf der y-Achse aufgetragen.

3.1.4 Identifizierung der krankheitsassoziierten Region

Die Autozygotiekartierung der assoziierten Region auf BTA21 konnte zwei homozygote Segmente auf diesem Chromosom identifizieren. Der erste homozygote Bereich (31.930.607 bp – 32.772.171 bp) ist 841.564 bp lang und besteht aus 111 SNPs. Zusätzlich zu den acht betroffenen Kälber tragen 357 nicht-betroffene FV-Bullen diese Region homozygot. Die zweite homozygote Region ist am distalen Ende des BTA21 lokalisiert (69.767.699 bp – 71.573.501 bp) (Abbildung 3.6 A). Zwei nicht-betroffene FV-Bullen tragen den identifizierten Haplotypen ebenfalls homozygot.

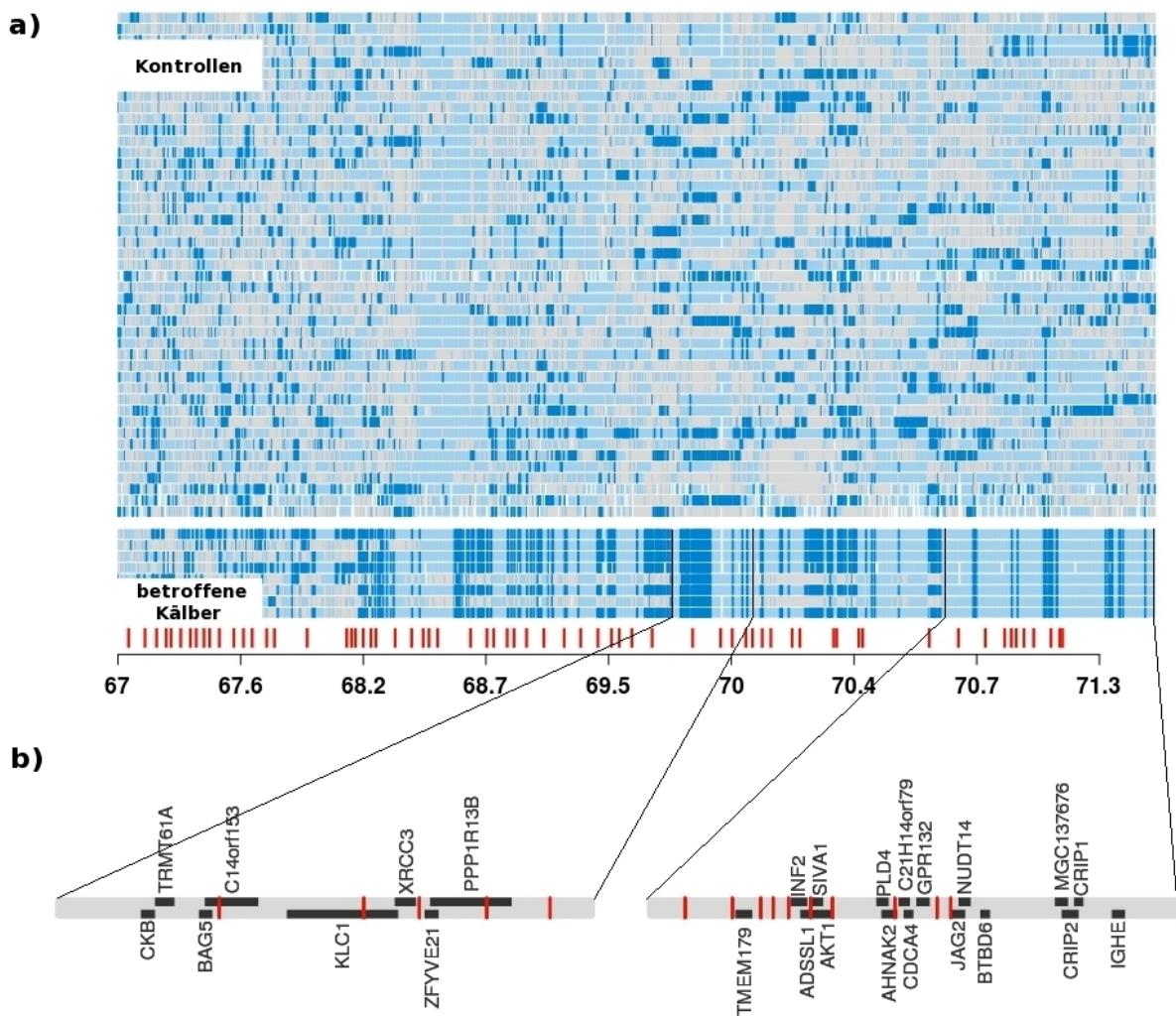


Abbildung 3.6: Genotypen der acht betroffenen Kälber und 45 zufällig ausgewählten Kontrolltieren der distalen Region auf BTA21 (67 Mb – 71,57 Mb)

(A) Homozygote Genotypen werden in dunkel- bzw. hellblau (AA, BB), heterozygote (AB) in grau dargestellt. Die roten Balken entsprechen den SNPs des bovinen SNP50 BeadChips. (B) Gengehalt der beiden homozygoten Bereiche basierend auf dem UMD3.1-Assembly mit eingezeichneten SNPs des bovinen SNP50 BeadChips (rot).

In zwei der untersuchten betroffenen Tieren (G4 und G31) konnte eine Unterbrechung dieser homozygoten Region identifiziert werden, welche den Bereich in zwei ausgedehnte Homozygotiesegmente unterteilt (Abbildung 3.7).

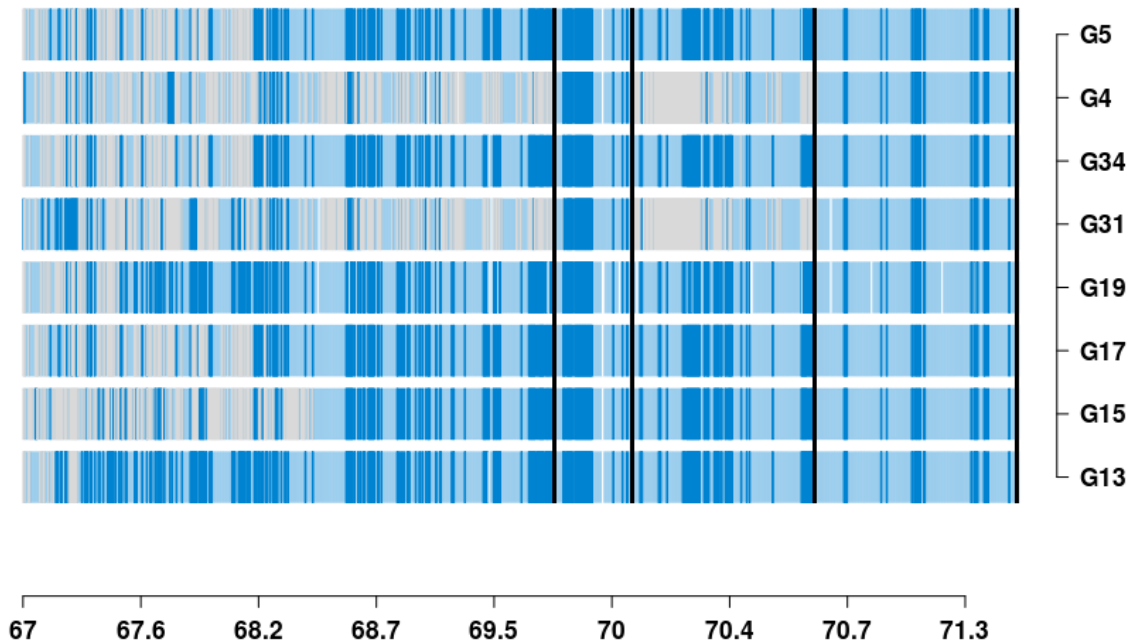


Abbildung 3.7: Homozygotiesegmente der betroffenen Kälber auf Chromosom 21

Homozygote Genotypen sind in dunkel- bzw. hellblau (AA, BB), heterozygote (AB) in grau dargestellt. Die Tiernummern (G5-G34) entsprechen der internen Labornummer. G4 und G31 zeigen die Unterbrechung der homozygoten Region. Die beiden homozygoten Bereiche sind mit schwarzen Balken eingegrenzt dargestellt.

Der erste homozygote Bereich ist ~297 kb lang und bei 69.767.699 bp – 70.064.497 bp lokalisiert. Innerhalb dieses Blocks befinden sich acht Gene (*APOPT1*(=*C14ORF153*), *BAG5*, *CKB*, *KLC1*, *PPP1R13B*, *TRMT61A*, *XRCC3*, *ZFYVE21*) (Abbildung 3.6 B).

Das zweite homozygote Segment ist ~1023 kb lang und bei 70.550.045 bp – 71.573.501 bp lokalisiert. Auf diesem chromosomalen Bereich befinden sich insgesamt 17 unterschiedliche Transkripte (*ADSSL1*, *AHNAK2*, *AKT1*, *BTBD6*, *CDCA4*, *CRIP1*, *CRIP2*, *GPR132*, *IGHE*, *INF2*, *JAG2*, *MTA1* (=MGC137676), *NUDT14*, *PLD4*, *SIVA1*, *TMEM179*, *C21H14ORF79*) (Abbildung 3.6 B). Unter diesen Genen befinden sich zwei cysteinreiche Proteine (*CRIP1* und *CRIP2*). CRIPs sind Transporter, die hauptsächlich im Darm exprimiert werden (HALLQUIST *et al.* 1996) und essentiell für die Zinkabsorption sind, da sie das Ion während des transmucosalen Transports binden (HEMPE und COUSINS 1991). Die funktionelle Ähnlichkeit der beiden Transkripte zu *SLC39A4* macht sie zu Kandidatengenen für die Erkrankung beim Deutschen

Fleckvieh. Weiterhin spielen die meisten der hier lokalisierten Gene vor allem bei der Regulation der verschiedenen zellulären Mechanismen wie Apoptose, Zellentwicklung und Signalweiterleitung eine Rolle (z.B. (LIN und YE 2003; HAYASHI *et al.* 2006; DU *et al.* 2009; KILLIAN *et al.* 2012)).

Die Frequenz des Risikohaplotypen wurde basierend auf 10.355 Genotypendaten gesunder Tiere der deutschen Fleckvieh-Population geschätzt. 380 FV-Rinder tragen eine Kopie des Haplotypen, zwei Tieren sind homozygote Haplotypenträger, woraus sich eine Frequenz des Haplotypen von 1,86 % ergibt.

3.1.5 Analyse des *CRIP1*-Gens

Mitglieder der LIM-Proteinfamilie sind durch mindestens eine LIM (Lin11, Isl-1, Mec-3)-Domäne charakterisiert. Diese Domäne ist durch ein einzigartiges zinkbindendes, cysteinreiches Motiv (C-X₂-C-X₍₁₆₋₂₃₎-(H/C/D)-X₂-(C/E/H)-X₂-C-X₂-C-X₍₁₆₋₂₁₎-C-X₍₂₋₃₎-(C/H/D)) gekennzeichnet (PÉREZ-ALVARADO *et al.* 1996). Sie besitzen zinkbindende Eigenschaften und werden in verschiedensten Proteinen exprimiert. Das cysteinreiche intestinale Protein 1 (CRIP1) gehört zur Familie der Gruppe-2 LIM Proteine. Charakteristisch für die Struktur dieses Proteins ist das Vorhandensein nur einer LIM-Domäne (LANNINGHAM-FOSTER *et al.* 2002). CRIP1 wird hauptsächlich im Darm sowie im Immunsystem exprimiert (HALLQUIST *et al.* 1996; COUSINS und LANNINGHAM-FOSTER 2000). Zusätzlich wird das Protein im geringeren Ausmaß auch in Lunge, Milz, Nebennieren und den Hoden ausgeprägt (HEMPE und COUSINS 1991). Untersuchungen konnten zeigen, dass Zinkionen während des transmucosalen Transports von CRIP1 gebunden werden. Dadurch wurde verdeutlicht, dass das cysteinreiche Protein in der Transporter-vermittelten Zinkresorption des Darms eine entscheidende Rolle spielt. Dies spricht für eine grundsätzliche Rolle des Transporters bei der Nahrungsaufnahme oder im intestinalen Metabolismus (HEMPE und COUSINS 1991). Aufgrund der hohen funktionalen Ähnlichkeit zu *SLC39A4* und der Lokalisation des Gens in dem krankheitsassoziierten Bereich (70.550.045 bp – 71.573.501 bp) wurde *CRIP1* im Rahmen dieser Dissertation genauer molekulargenetisch analysiert.

Mittels einer BLAST-Suche konnte das bovine *CRIP1*-Gen auf Chromosom 21 (71.390.596 bp – 71.392.110 bp) lokalisiert werden. Basierend auf der *GenomeThreader*-Annotation wurde das ~1,5 kb große Gen in sechs Exons unterteilt (Abbildung 3.8), die ein Transkript von 1360 bp kodieren.

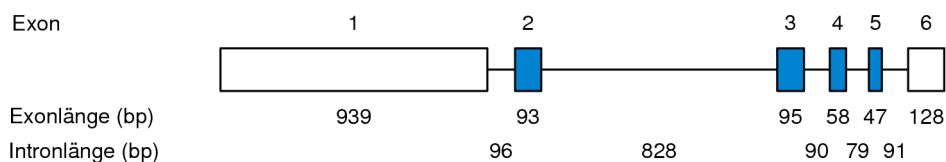


Abbildung 3.8: Graphische Darstellung der Genstruktur von *CRIP1*

Kodierende Sequenzbereiche sind blau, untranslatierte Regionen weiß und intronische Bereiche durch schwarze Balken dargestellt. Zusätzlich ist die Exon- und Intronlänge basierend auf UMD3.1-Assembly-Informationen in Basenpaaren (bp) angegeben.

Eine Besonderheit des Gens sind die beiden nicht-kodierenden Exons im 5'- bzw. im 3'-Bereich. Die kodierende Sequenz setzt sich aus 231 bp zusammen, das entsprechende Protein besteht aus 77 Aminosäuren. Der Translationsstart des Transkripts ist im zweiten Exon lokalisiert, der Translationsstopp befindet sich im fünften Exon des Gens. Das menschliche *CRIP1*-Gen besteht ebenfalls aus sechs Exons, Exon 1 und 6 sind nicht kodierend. Die LIM-Domäne des bovinen Proteins wird von Exon 2-4 kodiert und ihre Lokalisation ist mit der humanen Anordnung vergleichbar. Die detaillierte Intron-Exon-Organisation des bovinen Gens mit Positionsangaben im UMD3.1-Assembly wird in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4: Intron-Exon-Organisation des *CRIP1*-Gens in UMD3.1

Nr.	Exonlänge (bp)	Position in cDNA	Position BTA 21 ^{b)}	3' Spleißakzeptor ... 5' Spleißdonor ^{a)}	Nr.	Intronlänge (bp)
1	939	1 - 939	71.393.143 – 71.392.205	cggag ACCCG ... TCCA Agt cca	1	96
2 ^{c)}	93	940 - 1032	71.392.108 – 71.392.016	cccag TCCAG ... CTTT Ggt gag	2	828
3	95	1033 - 1127	71.391.187 – 71.391.093	tgcag CTGAG ... CCGAG gtc gg	3	90
4	58	1128 - 1185	71.391.002 – 71.390.945	tgcag CATGA ... CAAAG gtat g	4	79
5 ^{d)}	47	1186 - 1232	71.390.865 – 71.390.819	tgcag GCTTT ... CCCAG gtact	5	91
6	128	1233 - 1360	71.390.727 – 71.390.600	cacag GTTTT ... GGAAG ac ctgc		

a) Intronische Bereiche sind durch Kleinbuchstaben, exonische Bereiche durch Großbuchstaben gekennzeichnet, die Spleißseiten sind fett unterlegt; basierend auf GenomeThreader Annotation

b) Position basierend auf *Bos taurus* UMD3.1-Assembly

c) Exon enthält Startcodon

d) Exon enthält Stoppcodon

Eine Vorhersage des Transkriptionsstarts wurde mit der *Neural Network Promoter Prediction*-Software durchgeführt. Die Untersuchung der genomischen Sequenz ergab einen wahrscheinlichen Transkriptionsstart mit einer Vorhersagegenauigkeit von 0,89 (Abbildung 3.9).

Genauigkeit

0.89 GCTTCCTGCGGAGATAAGGACCCCTCCCCGCGCCGCGC**AG**GCTCCACGG

Abbildung 3.9: Vorhersage der Promotorsequenz des *CRIP1*-Gens

Der vorhergesagte Transkriptionsstart ist schwarz markiert. Der Genauigkeitswert gibt die Vorhersagegenauigkeit an, mit 0 als Minimum und 1 als Maximum (Reese, 2001).

Wie 2/3 aller Säugetier-Gene zeichnet sich *CRIP1* durch das Fehlen der klassischen TATA-/CAAT-Sequenzmotive im Promotor des Gens aus (COUSINS und LANNINGHAM-FOSTER 2000; FENOUIL *et al.* 2012). Zur Evaluierung möglicher CpG-Inseln wurde das 5'-Ende des bovinen *CRIP1*-Gens mit *CpGplot* untersucht. Hierbei konnten zwei CpG-Inseln identifiziert werden (Abbildung 3.10).

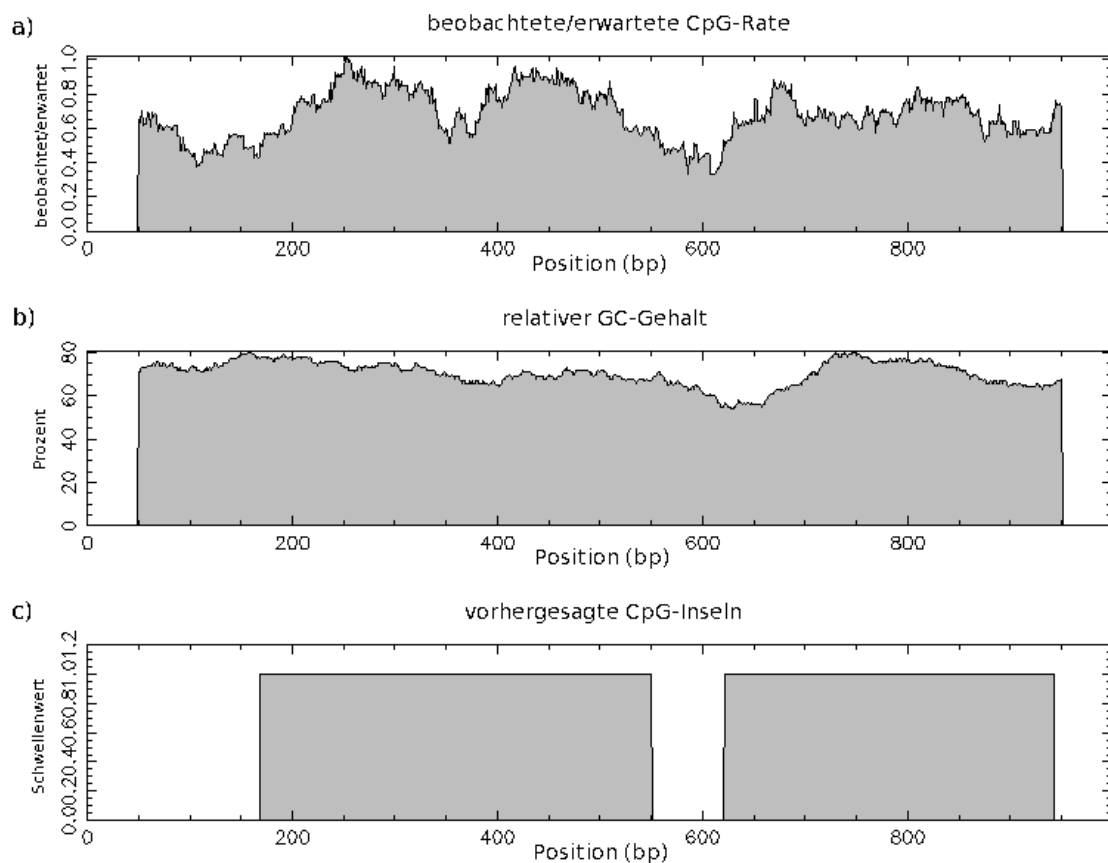


Abbildung 3.10: Vorhersage der CpG-Inseln im 5'-Bereich des *CRIP1*-Gens

a) zeigt die Rate der beobachteten vs. erwarteten CpG-Inseln (Schwellenwert 0,6 (Gardiner-Garden und Frommer 1987)), b) zeigt den relative GC-Gehalt und c) die Position der entdeckten CpG-Insel innerhalb des analysierten Bereichs

Für die Suche nach möglichen TFBS mit *ConSite* wurden die 5'-Bereiche der humanen und der bovinen *CRIP1*-Sequenz aligniert und hinsichtlich ihrer Konservierung auf das Vorhandensein von TFBS überprüft. Bei einem Sequenzkonservierungsgrad von $> 80\%$ konnten keine TFBS entdeckt werden. Dies zeigt den geringen Konservierungsgrad des 5'-Bereichs zwischen dem bovinen und humanen *CRIP1*-Gen.

Die Analyse der Konservierung der Aminosäuresequenz wurde über ein multiples Sequenzalignment der bovinen mit den Proteinsequenzen von Mensch, Maus und Ratte mittels *CLUSTALW* (LARKIN *et al.* 2007) durchgeführt (Abbildung 3.11). Das CRIP1-Protein zeigt einen sehr hohen Grad der Konservierung zwischen den verglichenen Spezies.

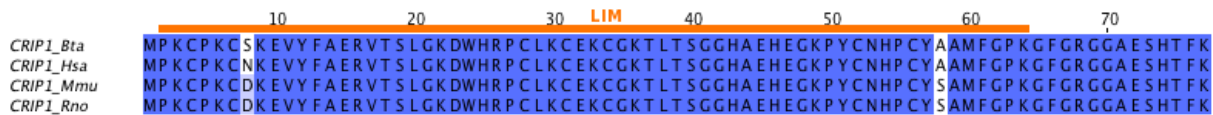


Abbildung 3.11: Multiples Alignment der CRIP1-Proteinsequenzen verschiedener Spezies

Vergleich der CRIP1-Proteinsequenzen von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa, NP_001302), Maus (Mmu, NP_031789) und Ratte (Rno, NP_001128405). Bereiche mit einer Sequenzidentität $\geq 50\%$ sind blau unterlegt. Die Lage der LIM-Domäne (LIM) ist, basierend auf Informationen der UniProtKB-Datenbank, orange gekennzeichnet. Die Skala entspricht der Position der Aminosäure im Alignment. Darstellung des Alignments ohne Kennzeichnung der Domänen mit Jalview2 (WATERHOUSE *et al.* 2009).

Die Sequenzidentität und -ähnlichkeit wurde unter Verwendung des Needleman-Wunsch-Algorithmus festgestellt. Der Vergleich der CRIP1-Proteinsequenzen verschiedener Spezies konnte zeigen, dass das Protein stark konserviert ist. Zwischen dem bovinen und dem menschlichen bzw. der murinen Sequenzen konnte eine Sequenzidentität von je über 97 % und eine Sequenzähnlichkeit von bis zu 100 % ermittelt werden (Tabelle 3.5). Die sehr starke Konservierung der CRIP1-Aminosäuresequenz ist ein Hinweis auf die wichtige Funktion des Proteins und der LIM-Domäne.

Tabelle 3.5: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des CRIP1-Proteins

Sequenz_1	Sequenz_2	Sequenzidentität (in %)	Sequenzähnlichkeit (in %)	Alignmentlücken (in %)
CRIP1_Bta	CRIP1_Hsa	98,7	100,0	0,0
CRIP1_Bta	CRIP1_Mmu	97,4	98,7	0,0
CRIP1_Bta	CRIP1_Rno	97,4	98,7	0,0

Paarweiser Vergleich der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des CRIP1-Proteins von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa, NP_001302), Maus (Mmu, NP_031789) und Ratte (Rno, NP_001128405). Die Berechnung erfolgte mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus (s.o.).

3.1.5.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse

Die Re-Sequenzierung des *CRIP1*-Gens erfolgte in einem Probenstet bestehend aus acht erkrankten Kälbern, 16 Anlageträgern und zwölf Kontrolltieren. Auf der Suche nach Polymorphismen wurden insgesamt ca. 6,4 kb re-sequenziert. Diese umfassen das gesamte *CRIP1* Gen sowie je ca. 2000 bp der flankierenden Regionen des 5'- bzw. 3'-Endes dieses Gens. Insgesamt konnten 20 variable Nukleotidpositionen identifiziert werden. Sieben der entdeckten Polymorphismen waren im ersten, nicht translatierten Exon des Gens lokalisiert, eine Substitution lag in der vorhergesagten Promotorsequenz, neun variable Positionen befanden sich in intronischen Bereichen des Gens. Zusätzlich wurden drei SNPs im 3'-Bereich des Gens entdeckt. Keiner der gefundenen Polymorphismen war mit einem autosomal-rezessiven Erbgang konsistent. Daher können Mutationen innerhalb dieses Gens als Ursache für das BHZD-ähnliche Syndrom ausgeschlossen werden. Eine Übersicht der gefundenen Polymorphismen wird in Tabelle 3.6 gegeben.

Tabelle 3.6: Polymorphismen im *CRIP1*-Gen in der Deutschen FV-Population

<i>SNP_Id</i>	<i>Position</i>	<i>5'- 3' – flankierende Sequenz</i>	<i>Region</i>	<i>Effekt</i>	<i>AS</i>
4203	71.392.819	ACAGACTCCC [C/T] CCACCCCCGA	EXON 1		
4204	71.392.554	CCTGGTAGGT [A/G] CCCCCGCCC	EXON 1		
4205	71.392.514	GGAAAGGTAC [C/G] ACACGCTCAT	EXON 1		
4206	71.392.424	GCGTGGGGTG [C/T] TCTCTCCCGC	EXON 1		
4207	71.392.416	TGCTCTCTCC [C/G] GCTCTGGGGA	EXON 1		
4208	71.392.402	CTGGGGAGCC [C/T] CCGCCCAGAG	EXON 1		
4209	71.392.316	CCTCCTGGAC [C/T] CCCTCGGACC	EXON 1		
4210	71.392.125	GACGCGGACC [C/G] GCGCGACCC	PROMOTOR		
4211	71.391.905	GGTGGGCCGA [G/T] GCGCAGGGG	INTRON 1		
4212	71.391.707	TATCTCGCCC [A/C] TTCCTGGCG	INTRON 1		
4213	71.391.628	CATCGTTAAG [A/T] AGAAACAGAC	INTRON 1		
4214	71.391.541	GGGAGGTGG [A/G] GGGCAGGAG	INTRON 1		
4215	71.391.412	TCCTCCAGCC [C/T] CACCCAAGCC	INTRON 1		
4216	71.391.394	GCCCTCGGGG [C/T] CCCCCGAGGAC	INTRON 1		
4217	71.391.262	GGCCTTGGC [A/G] GAGGGGTCTG	INTRON 1		
4218	71.390.809	GGTACTTCCC [AA/- -] GACGCCTCAC	INTRON 4		
4219	71.390.793	CCTACCCCCG [A/C] CCCGCCAGT	INTRON 4		
4220	71.390.176	CCCCACCCT [A/C] CACCCAGGGG	DOWNSTREAM		
4221	71.389.922	TTGGCTATGG [C/G] TCTGGCAGGC	DOWNSTREAM		
4222	71.389.848	GTGTGTGTGT [GT/- -] GAGAGAGAGA	DOWNSTREAM		

Übersicht der durch Re-Sequenzierung identifizierten Polymorphismen des *CRIP1*-Gens mit 5'- und 3'-

flankierenden Regionen in 36 FV-Rindern. Die *SNP_Id* entspricht der internen Identifikationsnummer, die *Position* entspricht der Lokalisation des SNPs auf *BTA21* im *UMD3.1-Assembly*. Die [] enthält die Referenzbase und den identifizierten Polymorphismus (fett). Das Referenz-Allel entspricht der Base der bovinen Referenzsequenz. Der Effekt entspricht der Auswirkung des Austauschs auf die Aminosäuresequenz, AS ist der Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz mit Positionsangabe.

3.1.6 Analyse des *CRIP2*-Gens

Das cysteinreiche intestinale Protein 2 (*CRIP2*) ist, wie *CRIP1*, ein Mitglied der zweiten Klasse der LIM-Proteinfamilie, welche zwischen einer und drei LIM-Domänen aber normalerweise keine DNA-bindenden Homodomänen enthält (CHEUNG *et al.* 2011). Durch die Abwesenheit dieser Domänen ist *CRIP2* nicht in der Lage direkt an spezifische Promotoren zu binden, kann aber durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren inhibierend auf die Transkription einwirken (CHEUNG *et al.* 2011). *CRIP2* wird in vielen unterschiedlichen Geweben, wie beispielsweise Herz, Skelettmuskulatur, Milz und Darm, exprimiert (KARIM *et al.* 1996).

Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu *CRIP1* und der Expression im Darmgewebe ist es wahrscheinlich, dass *CRIP2* neben seinen transkriptionellen Eigenschaften auch bei der intestinalen Zinkresorption eine Rolle spielt. Weiterhin ist das Gen in der identifizierten krankheitsassoziierten Region (70.550.045 bp – 71.573.501 bp) lokalisiert. Daher wurde *CRIP2* als Kandidatengen für das BHZD-ähnliche Syndrom in Betracht gezogen und im Rahmen dieser Dissertation intensiv molekulargenetisch untersucht.

Mittels einer BLAST-Suche konnte das bovine *CRIP2*-Gen auf Chromosom 21 (71.365.858 bp – 71.382.666 bp) lokalisiert werden. Das distale Ende des bovinen Chromosoms 21 enthält eine hohe Anzahl genomischer Bereiche ohne Sequenzinformation, die auch in einem Großteil des *CRIP2*-Gens lokalisiert sind. Daher wurde zur vorläufigen Analyse die mRNA-Sequenz des Gens von NCBI verwendet (NM_001079649). Basierend auf dieser Sequenz konnten acht Exons identifiziert werden. Aufgrund der fehlenden genomischen Sequenzinformationen konnte nur die genaue chromosomale Position des siebten und achten Exons bestimmt werden. Weiterhin konnte das erste Exon in reverser komplementärer Anordnung identifiziert werden. Die genomische Lokalisation von Exon 2-6 konnte erst nach intensiver Re-Sequenzierung (siehe Kapitel 3.1.6.1) bestimmt werden. Abbildung 3.12 zeigt die Struktur des Gens sowie die Exon- und Intronlänge basierend auf den Informationen der *GenomeThreader*-Annotation nach der Re-Sequenzierung des genomischen Bereichs. Das re-sequenzierte Transkript hat eine Länge von 1102 bp.



Abbildung 3.12: Darstellung der Genstruktur von CRIP2

Kodierende Sequenzbereiche sind blau, untranslatierte Regionen weiß und intronische Bereiche durch schwarze Balken dargestellt. Zusätzlich ist die Exon- und Intronlänge basierend auf der GenomeThreader-Information nach der Re-Sequenzierung in Basenpaaren (bp) angegeben.

Das Protein besteht aus 208 Aminosäuren. Sowohl im bovinen als auch im humanen Transkript befindet sich der Translationsstart im ersten und der Translationsstopp im letzten Exon. Das humane Gen besitzt acht Transkriptvarianten, von denen aber nur drei proteinkodierend sind. Die Intron-Exon-Organisation des bovinen Transkripts ist mit der humanen Variante 1 vergleichbar. Die erste LIM-Domäne des bovinen Proteins wird in Exon 1-3 kodiert, die zweite LIM-Domäne wird in Exon 5-7 kodiert. Die detaillierte Intron-Exon-Organisation des Gens mit Positionsangaben im UMD3.1-Assembly wird in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Intron-Exon-Organisation des CRIP2-Gens

Nr.	Exonlänge (bp)	Position in cDNA	Position BTA 21 ^{b)}	3' Spleißakzeptor ... 5' Spleißdonor ^{a)}	Nr.	Intronlänge (bp)
1 ^{c)}	106	1 - 106	71.380.210 – 71.380.105	cggagGCAGC ... CTTCGgtgag	1	2864
2	95	107 - 201	N's ^{d)}	cccagCTGAG ... CCGAGgtaag	2	77
3	58	209 - 259	N's ^{d)}	cctagCATGA ... CAAAGgtgag	3	264
4	142	260 - 400	N's ^{d)}	cccagGGGTG ... CAAAGgtggg	4	71
5	69	401 - 469	N's ^{d)}	cccagCCTCC ... CTTCGgtgag	5	75
6	95	468 - 564	N's ^{d)}	cccagCCGAG ... CGGAGgtgag	6	495
7	58	563 - 622	71.382.000 – 71.382.059	cttagCACGA ... CAAGGgtgag	7	73
8 ^{d)}	536	621 - 1158	71.382.131 – 71.382.668	tgtagGAGTG ...CAAGGgcgca		

a) Intronische Bereiche sind durch Kleinbuchstaben, exonische Bereiche durch Großbuchstaben gekennzeichnet, die Spleißseiten sind fett unterlegt; basierend auf GenomeThreader Annotation

b) Position basierend auf *Bos taurus* UMD3.1-Assembly,

c) Exon enthält Startcodon, d) Exon enthält Stoppcodon

e) Exon in reverse komplementärer Orientierung angeordnet, aufgrund fehlender Sequenzinformationen der Referenzsequenz,

f) die Referenzsequenz enthält Bereiche mit unbekannter Sequenzinformationen (N's), daher ist die Bestimmung der Position des Exons nicht möglich

Die Vorhersage des Transkriptionsstarts wurde mit der *Neural Network Promoter Prediction*-Software durchgeführt. Die Untersuchung der genomischen Sequenz ergab drei wahrscheinliche Transkriptionsstarts, alle mit einem Genauigkeitswert von mindestens 0,8. Der wahrscheinlichste Promotor lag 136 bp vor dem Translationsstart (Abbildung 3.13). Es konnte keine TATA-Box identifiziert werden, jedoch eine CAAT-Box. Basierend auf der Lokalisation der CAAT-Box und einem Genauigkeitswert von 0,9 wurde der dritte Promotor als am wahrscheinlichsten erachtet.

Genauigkeit	
0,80	CGGGCGGCCAGACCCCGGGGGCGGGCTCCCGACGCCCGC C CCGGCCGCA
0,87	ATGGGCGAGCGGACAGCCGGGCGGGCGGGCGGGCGCGGC G GGCGCGGCG
0,90	CCGGCCGCAGG CCAAT GGGCGAGCGGACAGCCGGGCGGGCGGGCGGGCG CGGCGGGCGCGGCGGAGGC A GCGGCTGCG

Abbildung 3.13: Vorhersage der Promotorsequenz des CRIP2-Gens

Der vorhergesagte Transkriptionsstart ist schwarz markiert, promotorspezifische Elemente sind umrandet. Der Genauigkeitswert gibt die Vorhersagegenauigkeit an, mit 0 als Minimum und 1 als Maximum (Reese, 2001).

Zur Evaluierung möglicher CpG-Inseln wurde das 5'-Ende des Gens mit *CpGplot* genauer untersucht. Hierbei konnte eine 588 bp lange CpG-Insel lokalisiert werden (Abbildung 3.14). Es ist davon auszugehen, dass diese GC-reiche Region zusammen mit der identifizierten CAAT-Box als Transkriptionsinitiationsmotiv fungiert.

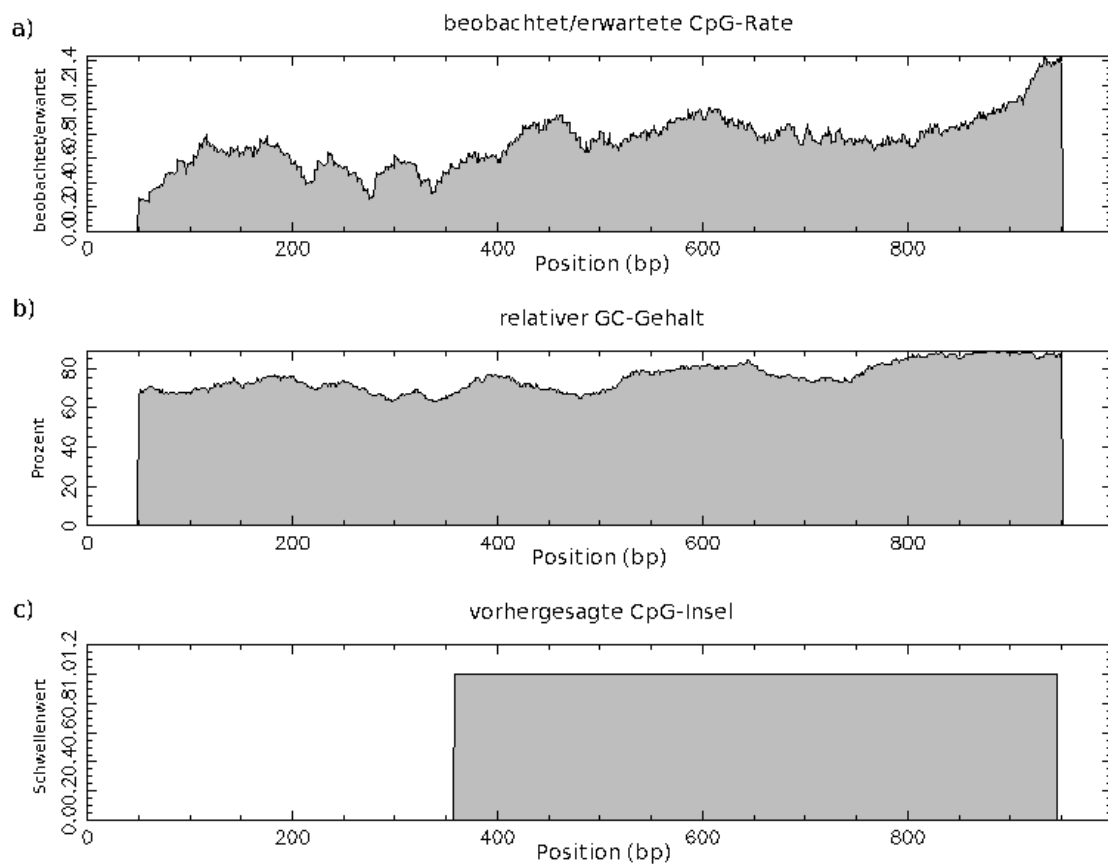


Abbildung 3.14: Vorhersage der CpG-Insel im 5'-Bereich des CRIP2-Gens

a) zeigt die Rate der beobachteten vs. erwarteten CpG-Inseln (Schwellenwert 0,6 (Gardiner-Garden und Frommer 1987)), b) zeigt den relativen GC-Gehalt und c) die Position der entdeckten CpG-Insel innerhalb des analysierten Bereichs

Für die Suche nach möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen mit *ConSite* wurden die 5'-Bereiche der bovinen und menschlichen *CRIP2*-Sequenzen aligniert und hinsichtlich ihrer Konservierung auf das Vorhandensein von TFBS überprüft. Bei einem Konservierungsgrad von $> 80\%$ konnten zwei *Sox17*-Bindestellen detektiert werden (Abbildung 3.15). Innerhalb der beiden *Sox17*- Bindestellen konnten keine Polymorphismen identifiziert werden (siehe Kapitel 3.1.6.1).

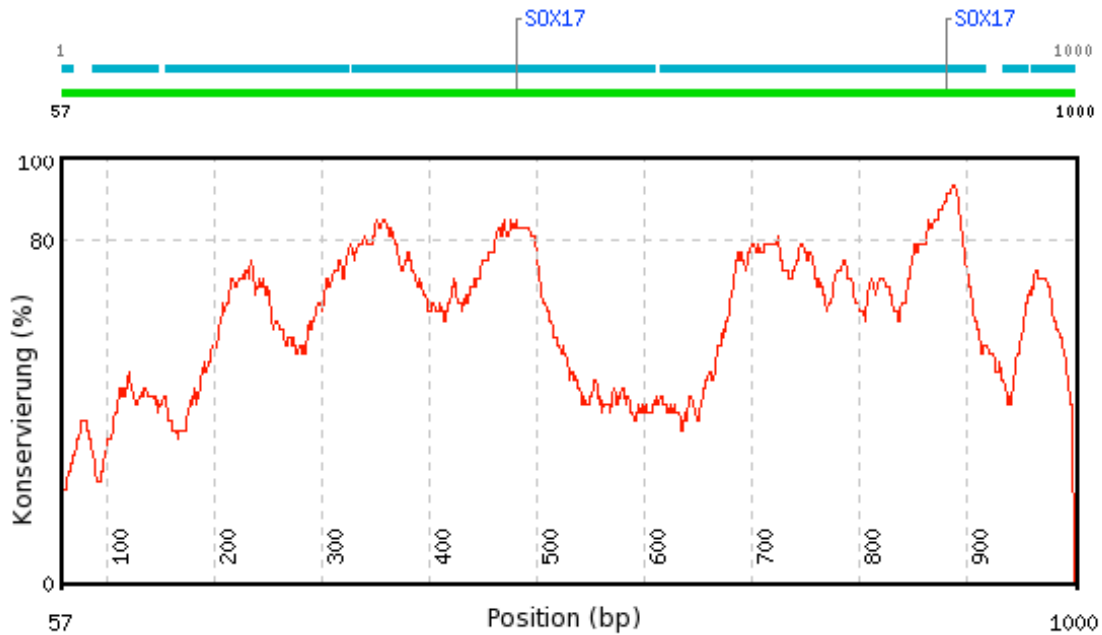


Abbildung 3.15: Vorhersage der Transkriptionsfaktorbindestellen in der 5'-Region des CRIP2-Gens

Visualisierung des Konservierungsprofils der alignierten bovinen und humanen 5'-Region des CRIP2-Gens. Die rote Linie zeigt die Konservierung der beiden Sequenzbereiche (Schwellenwert $\geq 80\%$). Die Lage der TFBS in konservierten Regionen der bovinen Sequenz (grün) wird angezeigt.

Die Analyse der Konservierung der Aminosäuresequenz wurde über ein multiples Sequenzalignment der bovinen mit den Proteinsequenzen von Mensch, Maus und Ratte unter Verwendung von *CLUSTALW* (LARKIN *et al.* 2007) durchgeführt (Abbildung 3.16). Das CRIP2-Protein besitzt zwei funktionale LIM-Domänen, die in allen untersuchten Spezies stark konserviert sind.

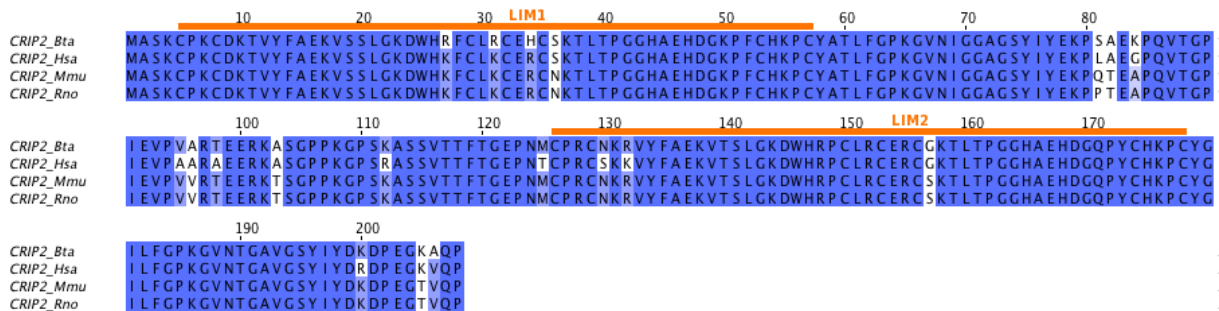


Abbildung 3.16: Multiples Alignment der CRIP2-Proteinsequenzen verschiedener Spezies

Vergleich der CRIP2-Proteinsequenzen von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa, NP_001303), Maus (Mmu, NP_077185) und Ratte (Rno, NP_071946). Bereiche mit einer Sequenzidentität $\geq 50\%$ sind blau unterlegt. Die Lage der LIM-Domänen (LIM 1-2) ist, basierend auf Informationen der UniProtKB-Datenbank, orange gekennzeichnet. Die Skala entspricht der Position der Aminosäure im Alignment. Darstellung des Alignments ohne Kennzeichnung der Domänen mit Jalview2 (WATERHOUSE *et al.* 2009).

Die Berechnung der Sequenzidentität und -ähnlichkeit erfolgte mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus. Die Untersuchung ergab zwischen dem humanen und dem bovinen Protein eine Sequenzidentität von 93,8 % sowie eine Ähnlichkeit von 96,6 %. Die Übereinstimmung zwischen der bovinen und den murinen Aminosäuresequenzen lag bei 94,2 % bzw. 95,7 % Sequenzähnlichkeit (Tabelle 3.8). Insgesamt konnte festgestellt werden, dass sowohl die funktionalen Domänen als auch die restlichen Bereiche des CRIP2-Proteins stark konserviert sind. Dies ist ein Hinweis auf die Funktionalität des Proteins.

Tabelle 3.8: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des CRIP2-Proteins

<i>Sequenz_1</i>	<i>Sequenz_2</i>	<i>Sequenzidentität (in %)</i>	<i>Sequenzähnlichkeit (in %)</i>	<i>Alignmentlücken (in %)</i>
<i>CRIP2_Bta</i>	<i>CRIP1_Hsa</i>	93,8	96,6	0,0
<i>CRIP2_Bta</i>	<i>CRIP1_Mmu</i>	94,2	95,7	0,0
<i>CRIP2_Bta</i>	<i>CRIP1_Rno</i>	94,2	95,7	0,0

Paarweiser Vergleich der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des CRIP2-Proteins von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa, NP_001303), Maus (Mmu, NP_077185) und Ratte (Rno, NP_071946). Die Berechnung erfolgte mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus (s.o.).

3.1.6.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse

Die Re-Sequenzierung des *CRIP2*-Gens erfolgte in einem Probenstet bestehend aus acht erkrankten Kälbern, 16 Anlageträgern und zwölf Kontrolltieren. Durch die Annotation des Gens konnte die chromosomale Position des siebten und achten Exons bestimmt werden. Zusätzlich konnte das erste Exon des Gens in reverser komplementärer Orientierung auf dem Chromosom lokalisiert werden. Die genaue Betrachtung dieser genomischen Region konnte zeigen, dass es sich hierbei um einen Assembly-Fehler dieses Bereichs handelte. Durch die Komplementierung des Abschnitts konnte die richtige genomische Orientierung des ersten Exons sowie eines Teils des ersten Introns wieder hergestellt werden. Für einen Großteil des 5'-flankierenden Bereichs sowie für den Bereich zwischen dem ersten Intron und dem siebten Exon standen keine Sequenzinformationen zur Verfügung. Zur Re-Sequenzierung fehlender Bereiche wurden Primerpaare für benachbarte Exons basierend auf der mRNA-Sequenz (NCBI, NM_001079649) designt, so dass die Basenabfolge der fehlenden genomischen Bereiche ermittelt werden konnte. Die vollständige genomische Sequenz wurden zum Update des existierenden Eintrags der genomischen *CRIP2*-Sequenz an NCBI übermittelt (AC_000178).

Insgesamt konnten ~8 kb sequenziert werden. Diese umfassten das gesamte *CRIP2*-Gen sowie je ca. 1500 bp der flankierenden Regionen der 5'- bzw. 3'-Enden. Es konnten 30 variable Nukleotidpositionen identifiziert werden (Tabelle 3.9). Acht Polymorphismen waren im 5'-Bereich, drei im 3'-Bereich des Gens lokalisiert und 18 variable Positionen befanden sich in intronischen Bereichen des Gens. Weiterhin konnte eine C→G-Substitution (p.101R) im vierten Exon identifiziert werden. Keine der entdeckten Varianten lag nur in den erkrankten Tieren homozygot vor.

Tabelle 3.9: Polymorphismen im CRIP2-Gen in 36 FV-Tieren

<i>SNP_Id</i>	<i>Position</i>	<i>5'- 3' – flankierende Sequenz</i>	<i>Region</i>	<i>Effekt</i>	<i>AS</i>
4223	71.375.537	GCCCAGGGCC [A/T] CTGCCAGGGC	UPSTREAM		
4224	71.375.757	AAGTGGGGGC [C/T] CATGAATTAT	UPSTREAM		
4225	71.375.849	AGGGGGCCCG [A/C] GGAGGCCTCC	UPSTREAM		
4226	71.376.630	GCCCTGGGCC [C/T] GATGCTACTG	UPSTREAM		
4227	71.376.749	CCCTAGGGGC [A/C] CCACGCCTTC	UPSTREAM		
4228	71.376.682	TGGGGAGGGC [A/G] CCTTCAGAGC	UPSTREAM		
4229	71.377.057	AAGGGAAGAG [A/G] GCGGCGGCAC	UPSTREAM		
4230	-	GGCGGGCTCC [C/T] GACGCCCCGC	UPSTREAM		
4231	71.379.940	GCGGCGACGA [A/G] CTGGGGGCGG	INTRON 1		
4232	71.379.396	CGGGAGGAGA [G/T] AGTGGGGAGG	INTRON 1		
4233	71.379.296	TGGTGTCTGG [C/T] TCACTCCCCC	INTRON 1		
4234	71.378.965	AGGCCGCGGA [A/G] CTTCCGGCTG	INTRON 1		
4235	71.378.881	AGGGTAGGGG [A/C] CAGCCCCAGG	INTRON 1		
4236	71.378.687	GAAGGGGCGG [A/G] GCCAGGAGG	INTRON 1		
4237	71.378.576	GTCCCCGACA [A/G] TGGCAGCTGG	INTRON 1		
4238	71.377.960	CTGGGAAGGA [G/T] TCCCCGCTCC	INTRON 1		
4239	71.377.701	ACCCTTAGCA [G/-] CTGGTCTCAG	INTRON 1		
4240	71.377.545	GGCCGTGTGA [A/G] GGGCAGGTGT	INTRON 1		
4241	-	GGGAGGGGCA [A/G] GTTTGAGCTG	INTRON 1		
4242	-	TAGTGGGGGC [A/G] GCCACATGGC	INTRON 1		
4243	-	ATGCCGAGGT [A/G] AGCGCCTCCC	INTRON 2		
4244	-	GCGGTCTGG [C/-] CCCCCATGGC	INTRON 3		
4245	-	CCAGTGCCT [GC/AA] CCCACCCA	INTRON 3		
4246	-	CTGAGGAGCG [C/G] AAAGCCAGCG	EXON 4	SYNONYM	R101
4247	-	TGGCTCGGGG [G/-] TGGGGTCGGC	INTRON 4		
4248	-	TGTCCCCTCC [C/G] CAGCCGAGAA	INTRON 4		
4249	71.382.125	AGCGGTCTCT [C/T] TCTGCAGGAG	INTRON 7		
4250	71.382.454	CCACATGCCC [C/-] TGGTGTCTCT	3'-UTR		
4251	71.382.583	CCCGCTGCC [G/T] CGCCAGCGCC	3'-UTR		
4252	71.382.978	GCTGAGGGCA [C/T] CCGGTGGAGG	DOWNSTREAM		

Übersicht der durch Re-Sequenzierung identifizierten Polymorphismen des CRIP2-Gens mit 5'- und 3'-flankierenden Regionen in 36 FV-Rindern. Die *SNP_Id* entspricht der internen Identifikationsnummer, die *Position* entspricht der Lokalisation des SNPs auf BTA21 im UMD3.1-Assembly, (-) *Position* aufgrund fehlender Sequenzinformation nicht determinierbar. Die [] enthält das Referenz-Allel und den identifizierten Polymorphismus (fett). Das Referenz-Allel entspricht der bovinen Referenzsequenz. Der *Effekt* entspricht der Auswirkung des Austauschs auf die Aminosäuresequenz, *AS* ist der Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz mit Positionsangabe.

3.1.7 Genomweite Re-Sequenzierung eines betroffenen Tieres

Da die Analyse der beiden Kandidatengene *CRIP1* und *CRIP2* des homozygoten Bereichs nicht zur Aufdeckung der verursachenden Variante geführt hat, wurde ein betroffenes Tier (G4) genomweit re-sequenziert.

Durch die genomweite Re-Sequenzierung dieses Tieres sowie 42 nicht-betroffener Tiere, darunter auch ein gesundes Tier, das den prädisponierenden Haplotypen homozygot trägt (Lab_Id = 58952), konnten insgesamt 9161 polymorphe Positionen (SNPs, Insertionen und Deletionen) in den beiden homozygoten, krankheits-assoziierten Regionen auf BTA21 identifiziert werden. 1501 Polymorphismen waren in der ersten homozygoten Region (69.767.699 bp – 70.064.497 bp) lokalisiert, 7660 polymorphe Positionen lagen in dem 1023 kb langen Bereich am distalen Ende des Chromosoms (70.550.045 bp – 71.573.501 bp). Drei SNPs und ein InDel (Insertion/Deletion) in dieser Region stimmten mit dem Vererbungsmuster einer autosomal-rezessiven Erkrankung überein, d.h. die Substitutionen lagen im erkrankten Kalb homozygot (aa), heterozygot (Aa) oder alternativ homozygot (AA) in dem gesunden Träger des prädisponierenden Haplotyps und alternativ homozygot (AA) in allen anderen Tieren vor (Tabelle 3.10). Keiner der offensichtlichen Kandidatenpolymorphismen war in den bereits untersuchten Genen *CRIP1* und *CRIP2* lokalisiert, was die Resultate der im Vorfeld durchgeführten Re-Sequenzierung bestätigt. Es konnte kein regulatorischer bzw. funktionaler Effekt für die intergenische Insertion/Deletion (BTA21:70.679.787 bp) bzw. für die intronische Variante in *PACS2* (BTA21:71.315.111 bp) identifiziert werden. Eine Überprüfung der *INF2*-Substitution (BTA21:70.842.696 bp) konnte zeigen, dass es sich bei dem identifizierten Aminosäureaustausch (p.H1231Y) um einen Annotationsfehler handelt und sich der Polymorphismus nicht innerhalb der kodierenden Region des Gens befindet. Da die identifizierte Variante (BTA21:71.001.232 bp) in der Phospholipase D4 (*PLD4*) zum Einbau eines verfrühten Stoppcodons führt, wurde im Folgenden die Phospholipase D4 intensiver untersucht.

Tabelle 3.10: Genotyp-Verteilung der vier identifizierten Varianten in der krankheitsassoziierten Region auf BTA21

Position	Variante	Gen	Region	Effekt	Genotypen		
					G4	58592	41 Tiere
70.679.787	INDEL	INTERGENISCH	-	-	-/-	G/-	GG
70.842.696	SNP	<i>INF2</i>	3'-BEREICH	-	TT	CC	CC
71.001.232	SNP	<i>PLD4</i>	EXON 6	W215X	AA	GG	GG
71.315.111	SNP	<i>LOC100299595</i> (= <i>PACS2</i>)	INTRON 30	-	TT	CC	CC

Die genomweite Re-Sequenzierung von 43 Tieren konnte 7660 polymorphe Positionen identifizieren. Drei SNPs und ein InDel stimmen mit dem vermuteten Vererbungsmuster überein. Die angegebenen Positionen basieren auf dem *Bos taurus* UMD3.1-Assembly. Die Region entspricht der Lokalisation der Variante in der genomischen Sequenz der Gene, der Effekt entspricht der Auswirkung des Austauschs auf die Aminosäuresequenz. G4 ist das betroffene Kalb, 58592 ist der homozygote gesunde Träger des prädisponierenden Haplotypen, die 41 Tiere entsprechen den restlichen genomweit re-sequenzierten FV-Bullen.

3.1.7.1 Analyse des *PLD4*-Gens

Bei Mitgliedern der Phospholipase D-Superfamilie handelt es sich um Signalenzyme, die hauptsächlich die Umwandlung von Phosphatidylcholin in Cholin und den sekundären Botenstoff Phosphatidsäure katalysieren (SU und FROHMAN 2010). Sie werden in Zusammenhang mit wichtigen Zellsignalwegen gebracht, welche Einfluss auf Zellwachstum, -entwicklung und -tod haben. Bisher zählen sechs verschiedene Enzyme zur Familie der Phospholipasen D, darunter zwei klassische und vier nicht-klassische Varianten (YOSHIKAWA *et al.* 2010). Klassische Phospholipase D-Formen zeichnen sich durch den Besitz einer Phox-Homologie-Domäne (PX) und Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) im N-terminalen Bereich und zwei konservierten HKD-Motiven (HxK(x)₄D(x)₆G(G/S)xN) im C-terminalen Bereich aus (YOSHIKAWA *et al.* 2010). Die PX- und PH-Domänen sind an der Bindung verschiedener Phospholipide sowie an der Membranassoziation der Phospholipasen beteiligt (BROWN *et al.* 2007). Phospholipase D4 (PLD4) ist ein Mitglied der nicht-klassischen Phospholipasen das bisher noch wenig erforscht wurde. Das Protein ist in der Zelle am Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie am Golgi-Apparat lokalisiert und wird im Gehirn sowie verstärkt in mesenchymalen Geweben wie Leber, Thymus und Milz exprimiert (YOSHIKAWA *et al.* 2010). Obwohl PLD4 die katalytisch wichtigen HKD-Motive enthält, ist bisher noch unklar, ob das Enzym eine klassische Phospholipaseaktivität besitzt.

Mittels einer BLAST-Suche konnte das bovine *PLD4*-Gen auf Chromosom 21 (70.995.733 bp – 71.004.742 bp) lokalisiert werden. Basierend auf der *GenomeThreader*-Annotation konnten elf Exons identifiziert werden, die ein Transkript aus 1735 bp kodieren (Abbildung 3.17).

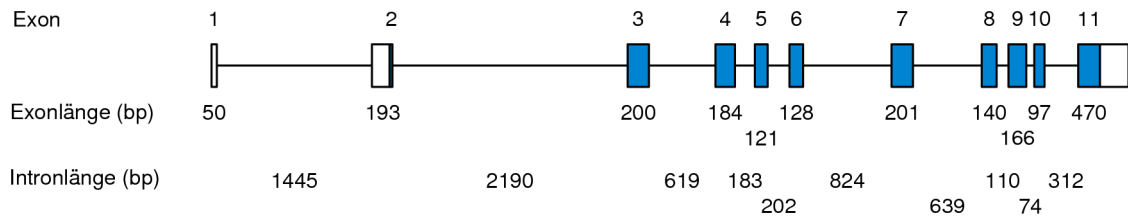


Abbildung 3.17: Graphische Darstellung der Genstruktur von *PLD4*

Kodierende Sequenzbereiche werden durch blaue Rechtecke, untranslatierte Bereiche durch weiße Rechtecke und intronische Regionen durch schwarze Balken dargestellt. Zusätzlich ist die Exon- und Intronlänge basierend auf UMD3.1-Assembly-Informationen in Basenpaaren (bp) angegeben.

Das entsprechende Protein hat eine Translationslänge von 491 Aminosäuren. Sowohl im bovinen als auch im humanen Transkript befindet sich der Translationsstart im zweiten Exon und der Translationsstopp im letzten Exon des Gens. Die Anordnung der beiden HKD-Motive im Protein des Rindes ist mit der menschlichen Organisation der Proteindomänen vergleichbar. Das erste HKD-Motiv wird im sechsten Exon, das zweite HKD-Motiv in Exon 10 und Exon 11 kodiert. Die detaillierte Intron-Exon-Organisation des Gens mit Positionsangaben im UMD3.1-Assembly wird in Tabelle 3.11 aufgeführt.

Tabelle 3.11: Intron-Exon-Organisation des *PLD4*-Gens in *UMD3.1*

Nr.	Exonlänge (bp)	Position in cDNA	Position BTA 29 ^{b)}	3' Spleißakzeptor ... 5' Spleißdonor ^{a)}	Nr.	Intronlänge (bp)
1	50	1 -50	70.995.733 – 70.995.782	tccagTCAGC ... GCAGAgtaag	1	1445
2 ^{c)}	193	51 - 243	70.997.228 – 70.997.420	tctagCTGGC ... TGGAGgtaag	2	2190
3	200	244 - 443	70.999.611 – 70.999.810	tgcagGTGCG ... TGCCGgtgag	3	619
4	184	444 - 627	71.000.429 – 71.000.613	tgcagGCTCG ... AGCCGgtgtg	4	183
5	121	628 - 748	71.000.797 – 71.000.917	aaaagGGCGA ... CCGAGgtggg	5	202
6	128	749 - 876	71.001.120 – 71.001.247	gtcagGTGCC ... CACAGgtgag	6	824
7	201	877 - 1077	71.002.072 – 71.002.272	cacagGTGAA ... TCTCGgtaag	7	639
8	140	1078 - 1217	71.002.912 – 71.003.051	cacagGCGTC ... GCCAGgtggg	8	110
9 ^{e)}	166	1218 - 1383	N's ^{f)} – 71.003.789	cccagCTACT ... ACGTGgtaag	9	74
10	97	1384 - 1480	71.003.864 – 71.003.960	ccaagAAAGT ... CATAGgtgag	10	312
11 ^{d)}	470	1481 - 1950	71.004.273 – 71.004.742	cgcagGCACG ... AAACGcgtgt	11	

a) Intronische Bereiche sind durch Kleinbuchstaben, exonische Bereiche durch Großbuchstaben gekennzeichnet, die Spleißseiten sind fett unterlegt; basierend auf GenomeThreader Annotation

b) Position basierend auf *Bos taurus* UMD3.1-Assembly, c) Exon enthält Startcodon, d) Exon enthält Stoppcodon

e) UMD3.1-Assembly ohne Sequenzinformation, Exonstruktur konnte durch Re-Sequenzierung determiniert werden

f) die Referenzsequenz enthält Bereiche mit unbekannter Sequenzinformationen (N's), daher ist die Bestimmung der Position des Exons nicht möglich

Die Vorhersage des Transkriptionsstarts mit der *Neural Network Promoter Prediction*-Software ergab drei wahrscheinliche Transkriptionsstarts mit einem Genauigkeitswert $\geq 0,80$. (Abbildung 3.18). Aufgrund der Konservierung der TATA-Box wurde der dritte Transkriptionsstart, 427 bp vor dem 5'-Ende des ersten Exons und ~ 2000 bp vor der ersten Base des Startcodons lokalisiert, als am wahrscheinlichsten angenommen.

Genauigkeit

```

0.98 AACACAATATTA TATAA GTTGTGGGCTTCCCTGATGGCTC AGCTAGTAAA
0.93 CACTTCATTA TATAA GTTGCAGGTGAACAATAGAGTGATT CACAACATTT
0.95 TTGTTTT TATAAA AATTTGGCCATAGTCCCTGTGTTGTAT AATTCCTCTT

```

Abbildung 3.18: Vorhersage der Promotorsequenz des *PLD4*-Gens

Der vorhergesagte Transkriptionsstart ist schwarz markiert, promotorspezifische Elemente sind grau umrandet. Der Genauigkeitswert gibt die Vorhersagegenauigkeit an, mit 0 als Minimum und 1 als Maximum (Reese, 2001).

Zur Evaluierung möglichen CpG-Inseln wurde das 5'-Ende des bovinen *PLD4*-Gens untersucht. Die Suche nach möglichen CpG-Inseln erbrachte keine Resultate.

Für die Suche nach möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen mit *ConSite* wurden aufgrund des vorgelagerten Exons und der Größe des ersten Introns ~3000 bp upstream des Translationsstarts der bovinen und menschlichen *PLD4*-Sequenz aligniert und hinsichtlich ihrer Konservierung auf das Vorhandensein von TFBS überprüft. Bei einem Konservierungsgrad von > 80 % konnten eine TFBS für *Spz1* identifiziert werden (Abbildung 3.19). Es konnte kein Polymorphismus innerhalb dieses Bereichs festgestellt werden (siehe Kapitel 3.1.7.2).



Abbildung 3.19: Vorhersage der Transkriptionsfaktorbindestellen in der 5'-Region des *PLD4*-Gens

Visualisierung des Konservierungsprofils der alignierten bovinen und humanen 5'-Region des *CRIP2*-Gens. Die rote Linie zeigt die Konservierung der beiden Sequenzbereiche (Schwellenwert $\geq 80\%$). Die Lage der TFBS in konservierten Regionen der bovinen Sequenz (grün) wird angezeigt.

Die Konservierung der Aminosäuresequenz wurde über ein multiples Sequenzalignment der bovinen mit den Proteinsequenzen von Mensch, Maus und Ratte unter Verwendung von *CLUSTALW* (LARKIN *et al.* 2007) durchgeführt (Abbildung 3.20). Hierbei lässt sich eine besonders starke Konservierung im Bereich der funktionalen Domänen des Proteins zeigen.

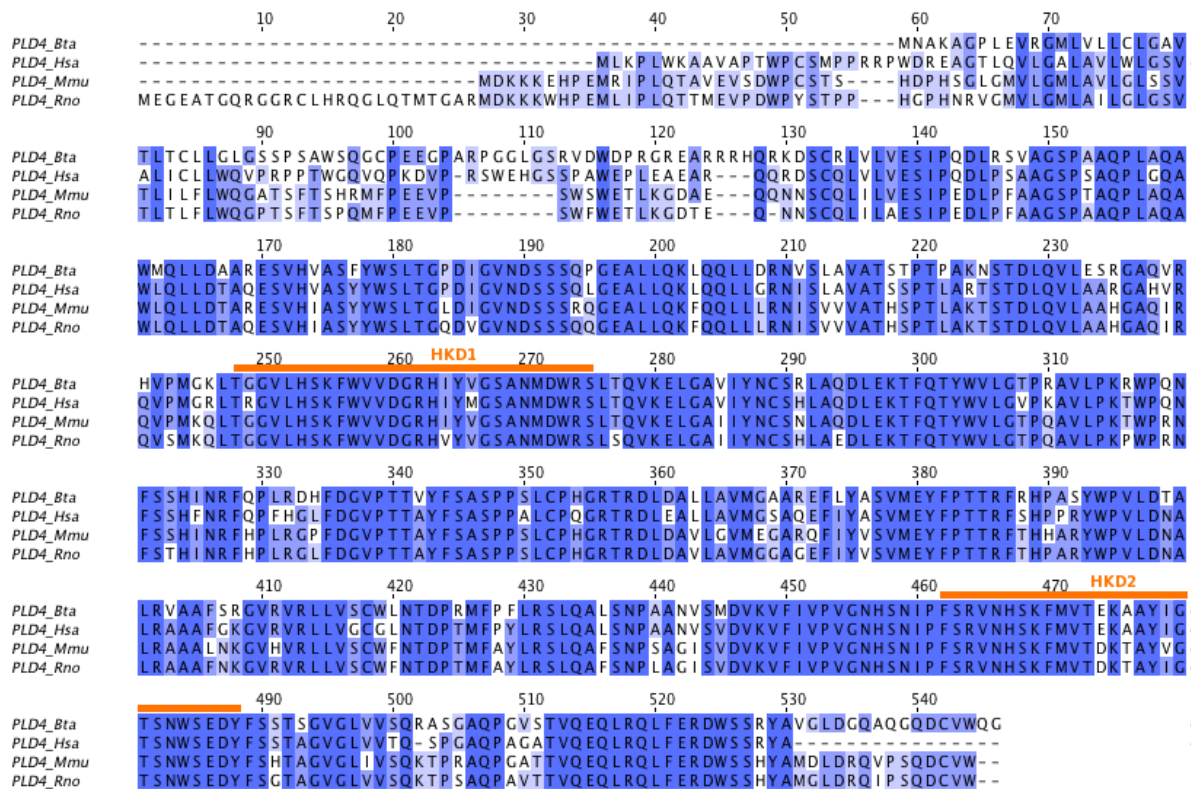


Abbildung 3.20: Multiples Alignment der PLD4-Proteinsequenzen verschiedener Spezies

Vergleich der PLD4-Proteinsequenzen von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa, NP_620145), Maus (Mmu, NP_035372) und Ratte (Rno, NP_001076446). Bereiche mit einer Sequenzidentität $\geq 50\%$ sind blau unterlegt. Die Lage der HKD-Motive (HKD 1-2) ist, basierend auf Informationen der UniProtKB-Datenbank, orange gekennzeichnet. Die Skala entspricht der Position der Aminosäure im Alignment. Darstellung des Alignments ohne Kennzeichnung der Domänen mit Jalview2 (WATERHOUSE *et al.* 2009).

Die Berechnung der Sequenzidentität und -ähnlichkeit erfolgte mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus. Die Analyse der Proteinsequenz ergab zwischen dem humanen und dem bovinen Protein eine Sequenzidentität von 69,9 % sowie eine Ähnlichkeit von 77,1 %. Die Übereinstimmung zwischen der bovinen und den murinen Aminosäuresequenzen lag bei 71,5 % bzw. 68 % Sequenzähnlichkeit (Tabelle 3.12).

Tabelle 3.12: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des PLD4-Proteins

<i>Sequenz_1</i>	<i>Sequenz_2</i>	<i>Sequenzidentität (in %)</i>	<i>Sequenzähnlichkeit (in %)</i>	<i>Alignmentlücken (in %)</i>
<i>PLD4_Bta</i>	<i>PLD4_Hsa</i>	75,1	81,8	5,5
<i>PLD4_Bta</i>	<i>PLD4_Ssc</i>	77,3	82,9	6,5
<i>PLD4_Bta</i>	<i>PLD4_Mmu</i>	67,6	76,2	7,9
<i>PLD4_Bta</i>	<i>PLD4_Rno</i>	65,0	72,7	12,7

Paarweiser Vergleich der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des PLD4-Proteins von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa, NP_620145), Maus (Mmu, NP_035372) und Ratte (Rno, NP_001076446). Die Berechnung erfolgte mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus (s.o.).

3.1.7.2 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse

Bei der genomweiten Re-Sequenzierung konnten insgesamt 52 Polymorphismen in der genomischen Region des *PLD4*-Gens identifiziert werden (Tabelle 9.5). 14 variable Positionen waren im 5'-Bereich, drei im 3'-Bereich des Gens lokalisiert und 26 SNPs wurden in den intronischen Regionen gefunden. Weiterhin wurden neun Mutationen im kodierenden Sequenzbereich des *PLD4*-Gens identifiziert. Fünf der exonischen SNPs (p.L79, p.L106, p.D108, p.D127, p.P272) führten zu keinem Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz. Des Weiteren konnte eine A→G-Mutation im vierten Exon entdeckt werden, die zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch (p.D86G) führt. Im zehnten Exon konnte ein C→T-Polymorphismus gefunden werden, der zum konservativen Austausch eines Alanins mit Valin (p.A401V) führt. Im letzten Exon wird durch eine G→A-Substitution ein Alanin gegen ein Threonin ausgetauscht (p.A455T). Das genomweit re-sequenzierte betroffene Kalb (G4) trägt keinen der oben genannten Polymorphismen, so dass eine mögliche Kausalität der Mutationen für das beschriebene Krankheitsbild ausgeschlossen werden kann. Durch den systematischen Vergleich der Sequenzen konnte im sechsten Exon des *PLD4*-Gens eine G→A-Substitution identifiziert werden, die zum Einbau eines verfrühten Stoppcodons (p.W215X) führt (siehe Tabelle 3.10). Aufgrund möglicher Sequenzierfehler der genomweiten Re-Sequenzierung wurde die identifizierte Mutation mittels Re-Sequenzierung (nach Sanger) überprüft. Die Re-Sequenzierung konnte bestätigen, dass das erkrankte Kalb (G4) diesen Polymorphismus homozygot trägt (Abbildung 3.21 A). Zudem konnte diese Variante bei keinem anderen analysierten Tier homozygot nachgewiesen werden. Der gesunde, homozygote Träger des prädisponierenden Haplotypen trägt die Stoppmutation nicht (Abbildung 3.21 B). Dies unterstützt die Hypothese, dass zwei identische Haplotypen in der Population vorkommen, die sich nur an der kausalen Variante unterscheiden. Der verfrühte Einbau des Stoppcodons führt zur Entstehung eines fehlerhaften Proteins, da das erste katalytisch-aktive HKD-Motiv nur unvollständig und das zweite HKD-Motiv gar nicht translatiert wird. Man kann daher davon ausgehen, dass das entstehende Protein in seiner Funktion stark eingeschränkt bis nicht funktionsfähig ist oder aber schon die fehlerhafte mRNA aufgrund des Nonsense-vermittelten-mRNA-Abbaus vor der Translation abgebaut wird.

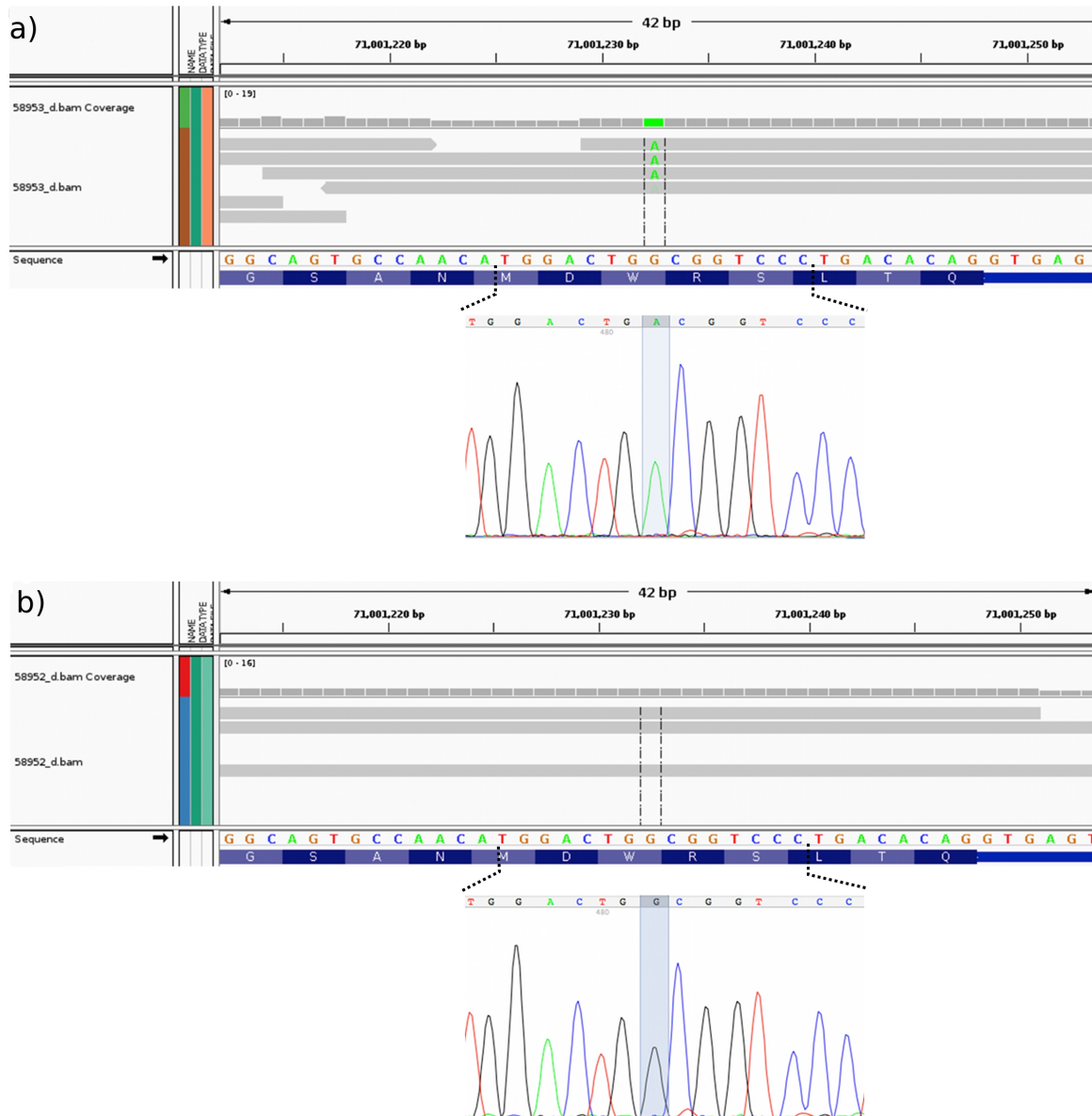


Abbildung 3.21: Re-Sequenzierung der PLD4-Stoppmutation in zwei homozygoten Trägern des krankheitsassoziierten Haplotyps

Die Visualisierung der Daten der genomweiten Re-Sequenzierung erfolgte mittels IGV (integrative genomics viewer, <http://www.broadinstitute.org/igv/>) (ROBINSON et al. 2011, THORVALDSDÓTTIR et al. 2013). Die Chromatogramme der Re-Sequenzierung nach Sanger wurden mit 4peaks dargestellt.

Die Analyse der genomweiten Re-Sequenzierung konnte eine Stoppmutation in PLD4 aufzeigen. Mittels Re-Sequenzierung (nach Sanger) konnte **a)** die homozygot vorliegende Stoppmutation (AA) im sechsten Exon des PLD4-Gens in dem betroffenen Kalb (G4) und **b)** die alternativ homozygot vorliegende Stoppmutation (GG) in einem nicht-betroffenen Tier (58592), das den prädisponierenden Haplotypen homozygot trägt, bestätigt werden.

Zur Überprüfung dieser Variante und dem Auffinden anderer Polymorphismen innerhalb des Gens wurde das komplette *PLD4*-Gen in einem Probenet bestehend aus acht erkrankten Kälbern, 16 Anlageträgern und zwölf Kontrolltieren re-sequenziert. 19 der über NGS identifizierten SNPs konnten bei der Re-Sequenzierung in den 36 FV-Rindern ebenfalls entdeckt werden (Tabelle 3.13). Die durch NGS identifizierte Stoppmutation (p.W125X) lag nur in den acht betroffenen Kälbern homozygot vor, was die Ergebnisse der genomweiten Re-Sequenzierung bestätigt. Keine der zusätzlich entdeckten Varianten lag nur in den acht betroffenen Tieren homozygot vor. Weiterhin konnte die Re-Sequenzierung der Variante in dem gesunden, homozygoten Träger des prädisponierenden Haplotypen (Lab_Id:58592) das Ergebnis der genomweiten Re-Sequenzierung verifizieren (Abbildung 3.21 B). Bei der Re-Sequenzierung der genomischen Region des *PLD4*-Gens in dem aus 36 FV-Rindern bestehenden Probenet wurden Bereiche der intronischen Regionen aufgrund ihrer Länge nicht berücksichtigt, wodurch sich die Diskrepanz der Anzahl der gefundenen SNPs zwischen NGS und Re-Sequenzierung der 36 FV-Rinder erklären lässt. Zudem handelt es sich bei den untersuchten 36 FV-Tieren um eine selektierte Stichprobe, d.h. Allele, die innerhalb der FV-Population nur selten auftreten, können in diesem Probenet aufgrund der Tierausswahl unterrepräsentiert sein.

Tabelle 3.13: Polymorphismen im PLD4-Gen in der Deutschen Fleckvieh-Population

SNP_Id	Position	5'- 3' – flankierende Sequenz	Region	Effekt	AS
4289	70.997.271	CGCAGAGGGA[A/G]GTACGGAGGA	EXON 2		
4290	70.997.368	TGCAAGCTGA[C/T]GGCCTGCGTC	EXON 2		
4291	70.999.953	AAGAGGCAGG[C/T]TCCGGGAGGG	INTRON 3		
4292	71.000.073	CAGCCCTCCC[G/T]CCTGGGGTAG	INTRON 3		
4293	71.000.096	CCACAGGCC[C/T]GCCCTCCCG	INTRON 3		
4294	71.000.520	GGATGCAGCT[A/G]CTGGACGCCG	EXON 4	SYNONYM	L106
4295	71.000.526	AGCTACTGGA[C/T]GCCGCCGAG	EXON 4	SYNONYM	D108
4296	71.000.637	GCCCCTGACT[C/T]GGAGCCCGCG	INTRON 4		
4297	71.000.641	CTGACTCGGA[G/T]CCCGCGGGCT	INTRON 4		
4298	71.000.794	CCTGCTCTAA[A/C]AGGGCGAGGC	INTRON 4		
4255	71.001.232	ACATGGACTG[A/G]CGGTCCCTGA	EXON 6	NONSENSE	W215X
4299	71.002.227	GCTTCCAGCC[A/G]CTCCGGGATC	EXON 7	SYNONYM	P272
4300	71.002.351	CTCGCCACC[C/T]GGGCCTGCC	INTRON 7		
4301	71.002.403	TGTGGTCCCC[A/G]GGGTGACCC	INTRON 7		
4302	71.002.465	CCTGGGTGGC[A/G]GGGGACGCTC	INTRON 7		
4303	71.002607	GGAACGGGGG[G/T]CAGGCGGCCA	INTRON 7		
4304	71.003.968	TAGGTGAGCC[A/G]GGCGGCAGCC	INTRON 10		
4305	71.004.001	GGCTCCACGC[A/G]AGGCCACCC	INTRON 10		
4306	71.004.188	ACCCCTCCAG[G/T]GGCCACAGGG	INTRON 10		

Übersicht der durch Re-Sequenzierung identifizierten Polymorphismen des PLD4-Gens mit 5'- und 3'-flankierenden Regionen in 36 FV-Rindern. Die SNP_Id entspricht der internen Identifikationsnummer, die Position entspricht der Lokalisation des SNPs auf BTA21 im UMD3.1-Assembly. Die [] enthält das Referenz-Allel und den identifizierten Polymorphismus (fett). Das Referenz-Allel entspricht der Base der bovinen Referenzsequenz. Der Effekt entspricht der Auswirkung des Austauschs auf die Aminosäuresequenz, AS ist der Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz mit Positionsangabe.

3.1.8 TaqMan®-Genotypisierung der p.W215X-Mutation

Zur Überprüfung der Stoppmutation wurde die Variante in insgesamt 2322 Rindern mittels TaqMan®-Assay genotypisiert. Das Probenset der 2322 Rinder setzte sich aus 1761 Fleckvieh-Tieren, 282 Holstein-Friesian und 280 Rindern der Rasse Braunvieh zusammen. Alle acht betroffenen Kälber tragen den Polymorphismus homozygot (AA). Zusätzlich konnte kein gesundes Tier als homozygoter Merkmalsträger der Variante identifiziert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die p.W215X-Mutation dem beobachteten Phänotyp zu Grunde liegt. Die untersuchte Variante segregiert nicht bei Rindern der Rasse Braunvieh und Holstein-Friesian. Die zwei Tiere, die den prädisponierenden Haplotypen homozygot tragen, sind alternativ homozygot (GG) bzw. heterozygot (AG) an der untersuchten Position. 159 der 1761 analysierten Fleckvieh-Rinder tragen diesen Haplotypen heterozygot. Davon sind 95 heterozygote Träger der Stoppmutation während 64 die nicht-betroffene Version des Haplotypen vererben (Tabelle 3.14). Die Frequenz des prädisponierenden Haplotypen beträgt 1,86 %. 59,7 % der Rinder, die den krankheitssassoziierten Haplotypen tragen, sind auch Träger der identifizierten p.W215X-Mutation. Daraus ergibt sich eine Frequenz von 1,1 % ($0,597 * 1,86\%$) für das Defektallel.

Tabelle 3.14: Genotypen der Stoppmutation in PLD4 für 2322 Rinder

Rasse	Tiergruppe	Anzahl	Genotyp für p.W215X		
			AA	AG	GG
FV	betroffene Kälber	8	8	-	-
	Mütter der Kälber	6	-	6	-
	gesunde Tiere, homozygot für Risikohaplotyp	2	-	1	1
	heterozygote Träger des Risikohaplotyps	159	-	95	64
	gesunde Tiere, kein Träger des Risikohaplotyps	1585	-	-	1585
HF	zufällig selektierte Tiere	282	-	-	282
BV	zufällig selektierte Tiere	280	-	-	280

Die Genotypen für die Stoppmutation wurden mittels TaqMan®-Genotypisierung für insgesamt 2322 Tiere ermittelt. Die Stoppmutation liegt nur in den betroffenen Tieren homozygot vor. 95 von 159 heterozygoten Trägern des prädisponierenden Haplotypen tragen die p.W215X-Mutation heterozygot, 64 tragen die Variante nicht. Tiere, die den prädisponierenden Haplotypen nicht tragen, tragen auch die Stoppmutation nicht. Bei Rindern der Rasse Holstein-Friesian (HF) und Braunvieh (BV) segregiert die Mutation nicht. Bei den 2322 genotypisierten Tieren handelt es sich nicht um eine repräsentative Stichprobe, es wurde nach Haplotypenträgern selektiert.

3.2 Thrombozytopathie (TCP)

3.2.1 Phänotypische Manifestation

Die klinische Beurteilung der betroffenen Rinder wurde von Veterinärmedizinern der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Im Rahmen der bovinen neonatalen Panzytopenie (BNP)-Untersuchungen fielen dort vermehrt FV-Kälber mit starker Blutungsneigung auf, deren Blutbilder jedoch nicht den BNP-typischen Mangel an Thrombozyten aufwiesen. Zudem zeigten sich ähnliche Befunde und Verläufe bei älteren Kälbern, Jungrindern oder Kühen. Daraufhin durchgeführte Thrombozytenfunktionstests ergaben, dass bei den betroffenen Rindern eine Störung der Thrombozytenfunktion vorlag, d.h. die Blutplättchen waren zwar in ausreichender Menge vorhanden, zeigten aber eine stark verminderte bis keine Aggregation. Betroffene Tiere hatten in der Regel ein ungestörtes Allgemeinbefinden, litten aber nach Verletzungen und/oder Injektionen an zum Teil massiven, längerfristigen Blutungen der Haut (Abbildung 3.22), sowie Blutungen der Nase und Schleimhäute. Vermehrt kam es auch zu großflächigen subkonjunktivalen Blutungen, der Bildung von Hämatomen und blutigen Beimengungen im Kot. Die Folgen dieser Blutungen variieren von vernachlässigbarem Blutverlust bis hin zu einer lebensbedrohlichen hämorrhagischen Anämie. Bei einer ersten Stammbaumanalyse einiger betroffener Rinder konnte ein gemeinsamer Vorfahre ermittelt werden, so dass ein genetischer Hintergrund der Erkrankung wahrscheinlich war. Bisher wurde eine erbliche Störung der Thrombozytenaggregation ausschließlich bei Simmental-Rindern im nordamerikanischen Raum (hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler-Rinder, HTS) beschrieben (SEARCY und PETRIE 1990; NAVARRE *et al.* 1995; MAPLETOFT *et al.* 2000; BOUDREAUX *et al.* 2007b). Kürzlich konnten Weisser und Kollegen erstmals auch einen Fall in der Deutschen Fleckvieh-Population beobachten (WEISSER *et al.* 2010). Aufgrund der beschriebenen Krankheitssymptome und der vorläufigen Stammbaumanalyse wurde, unter Anlehnung an die bisher erschienene Literatur, die vorläufige Diagnose „hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder/Thrombozytopathie (TCP)“ gestellt.



Abbildung 3.22: Krankheitssymptomatik der Blutgerinnungsstörung beim Fleckvieh

Fotos: Dr. med. vet. Annette Pfitzner

(A) FV-Kalb mit längerfristiger Blutung am Hals aufgrund einer gestörten Blutgerinnung (B) FV-Kalb mit längerfristiger Blutung im Schulterbereich aufgrund einer gestörten Blutgerinnung (C) Als Blutungsursache konnte eine Injektionswunde identifiziert werden

3.2.2 Analyse des *RasGRP2*-Gens

RasGRP2 (RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)), auch *CalDAG-GEFI* (Ca^{2+} and diacylglycerol regulated guanine nucleotide exchange factor 1) genannt, ist ein Mitglied der *CalDAG-GEF/RasGRP*-Familie intrazellulärer Signalmoleküle. Diese Moleküle sind an der Aktivierung kleiner G-Proteine der Ras Superfamilie beteiligt (CIFUNI *et al.* 2008). *RasGRP2* wird hauptsächlich in den Blutzellen (Thrombozyten und Leukozyten) exprimiert und spielt mittels der reversiblen Aktivierung des Integrin α 2 β 3-Rezeptors eine wichtige Rolle in der Blutgerinnungskaskade (siehe Abbildung 9.2) (BOUDREAUX *et al.* 2007a; STONE 2011).

Studien des Krankheitsbildes der HTS konnten einen nicht-synonymen Aminosäureaustausch (p.L324P) identifizieren, der für den Phänotyp verantwortlich zu sein scheint (BOUDREAUX *et al.* 2007b). Daher wurde *RasGRP2* in der vorliegenden Dissertation als Kandidatengen für die Erkrankung beim Deutschen Fleckvieh in Betracht gezogen und molekulargenetisch untersucht.

Mittels einer BLAST-Suche konnte das bovine *RasGRP2*-Gen auf Chromosom 29 (43.590.193 bp - 43.602.499 bp) lokalisiert werden. Basierend auf der *GenomeThreader*-Annotation konnten 15 Exons identifiziert werden, die ein Transkript von 1827 bp kodieren (Abbildung 3.23).

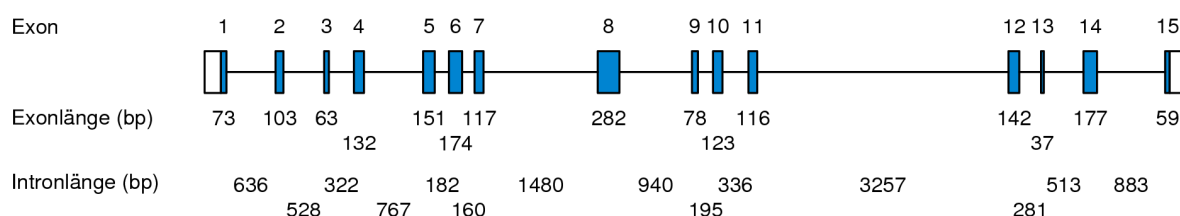


Abbildung 3.23: Graphische Darstellung der Genstruktur von *RasGRP2*

Kodierende Sequenzbereiche sind blau, untranslatierte Regionen weiß und intronische Bereiche durch schwarze Balken dargestellt. Zusätzlich ist die Exon- und Intronlänge basierend auf UMD3.1-Assembly-Informationen in Basenpaaren (bp) angegeben.

Das entstehende Protein setzt sich aus 608 Aminosäuren zusammen. Der Translationsstart des bovinen Transkripts befindet sich im ersten Exon des Gens, der Translationsstopp ist im letzten Exon lokalisiert. Das menschliche Gen besitzt, im Unterschied zum bovinen Gen, ein vorgelagertes und ein nachgelagertes Exon. Zudem besitzt das humane Protein drei alternative Transkripte, die sich im 5'-Bereich des Gens unterscheiden (NAGAMINE *et al.* 2010). Alle Transkripte kodieren dasselbe Protein. Eine Besonderheit des Gens ist das Fehlen der typischen AG/GT-

Spleißseiten des zweiten Introns (Tabelle 3.15). Die beiden Spleißseiten werden hier durch AT/AC ersetzt. Obwohl mehr als 99 % der Spleißseiten in Säugetiergenomen der AG/GT-Regel folgen, konnten in den letzten Jahren vermehrt Abweichungen dieser Regel entdeckt werden. Dabei geht man davon aus, dass alternative Spleißseiten auch durch alternative Mechanismen (Spleißosome) reguliert werden (BURSET *et al.* 2000).

Tabelle 3.15: Intron-Exon-Organisation des RasGRP2-Gens in UMD3.1

Nr.	Exon- länge (bp)	Position in cDNA	Position BTA 29 ^{b)}	3' Spleißakzeptor ... 5' Spleißdonor ^{a)}	Nr.	Intron- länge (bp)
1 ^{c)}	73	1 - 73	43.602.499 – 43.602.427	cggccATGGC ... CTTTGgtgag	1	636
2	103	74 - 176	43.601.790 – 43.601.688	gttagATGAT ... CACATatatac	2	528
3	63	177 - 239	43.601.160 – 43.601.097	ttcacCTACC ... GTCAGgtgag	3	322
4	132	240 - 371	43.600.774 – 43.600.643	accagGTACT ... AACGTgtgag	4	767
5	151	372 - 522	43.599.875 – 43.599.725	cccagCCCCA ... TCCTGgtgag	5	182
6	174	523 - 696	43.599.542 – 43.599.369	cccagTTCCA ... CAGAGgtgcc	6	160
7	117	697 - 813	43.599.208 – 43.599.092	cccagGAACT ... TCAAGgtgcc	7	1480
8	282	814 - 1095	43.597.611 – 43.597.330	CccagCTCTG ... TGATGgtgag	8	940
9	78	1096 - 1173	43.596.389 – 43.596.312	ctcagGTGTC ... CCTCGgtgag	9	195
10	123	1174 - 1296	43.596.116 – 43.595.994	cacagCCAAC ... TGGAGgtgag	10	336
11	116	1297 - 1412	43.595.657 – 43.595.542	ttcagTCTGT ... AACCAgtgag	11	3257
12	142	1413 - 1554	43.592.284 – 43.592.143	gacagGGACG ... CCCTGgtgag	12	281
13	37	1555 - 1591	43.591.861 – 43.591.825	ttcagATCCT ... CGAAGgtgag	13	513
14	177	1592 - 1768	43.591.311 – 43.591.135	cccagCCTGT ... TCCAGgtaag	14	883
15 ^{d)}	59	1769 - 1827	43.590.253 – 43.590.193	tgcagAGATC ... TGTAAttgat		

a) Intronische Bereiche sind durch Kleinbuchstaben, exonische Bereiche durch Großbuchstaben gekennzeichnet, die Spleißseiten sind fett unterlegt; basierend auf GenomeThreader Annotation

b) Position basierend auf *Bos taurus* UMD3.1-Assembly

c) Exon enthält Startcodon

d) Exon enthält Stoppcodon

Die Vorhersage des Transkriptionsstarts wurde mit der *Neural Network Promoter Prediction*-Software durchgeführt. Die Untersuchung der genomischen Sequenz ergab zwei wahrscheinliche Transkriptionsstart mit einem Genauigkeitswert von 0,92 bzw. 0,96. (Abbildung 3.24). Der wahrscheinlichere Transkriptionsstart liegt ~200 bp vor dem Translationsstart.

Genauigkeit
 0,92 CCTGGGTGCGTAAATCCCCGCCAGTGACTGGAGTTGCTGGTGGAGTCCAA
 0,96 CGGGCCAGACCGTTTAAACCCCGGGGCGTGGCCGCGGGGGGAAACGACTCCG

Abbildung 3.24: Vorhersage der Promotorsequenz des RasGRP2-Gens

Der vorhergesagte Transkriptionsstart ist schwarz markiert, promotorspezifische Elemente sind grau umrandet. Der Genauigkeitswert gibt die Vorhersagegenauigkeit an, mit 0 als Minimum und 1 als Maximum (Reese, 2001).

Zur Evaluierung möglicher CpG-Inseln wurde das 5'-Ende des bovinen *RasGRP2*-Gens mit *CpGplot* untersucht. Hierbei konnten zwei CpG-Inseln vorhergesagt werden (Abbildung 3.25). Die erste Inseln ist 233 bp lang und befindet sich am 5'-Ende des analysierten Bereichs. Die zweite vorhergesagte CpG-Insel besteht aus 201 bp und ist um den vorhergesagten Transkriptionsstart lokalisiert.

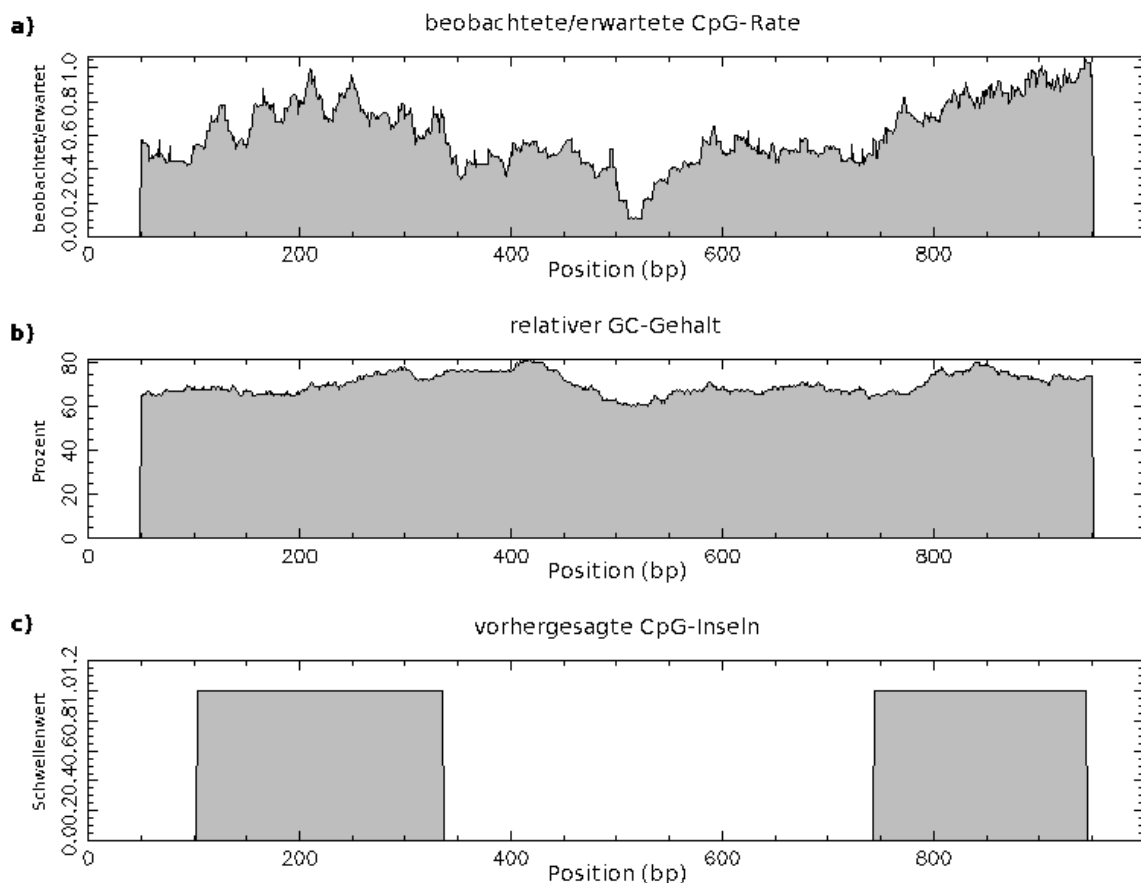


Abbildung 3.25: Vorhersage der CpG-Inseln im 5'-Bereich des RasGRP2-Gens

a) zeigt die Rate der beobachteten vs. Erwarteten CpG-Inseln (Schwellenwert 0,6 (Gardiner-Garden und Frommer 1987)), b) zeigt den relativen GC-Gehalt und c) die Position der entdeckten CpG-Inseln innerhalb des analysierten Bereichs

Für die Suche nach möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen mit *ConSite* wurden die 5'-Bereiche der bovinen und humanen *RasGRP2*-Gene aligniert und hinsichtlich ihrer Konservierung auf das Vorhandensein von TFBS überprüft. Bei einem Konservierungsgrad von > 80 % konnten keine TFBS entdeckt werden, da die Sequenzidentität zwischen der bovinen und der menschlichen 5'-Region gering ist.

Die Konservierung der Aminosäuresequenz wurde über ein multiples Sequenzalignment der bovinen Proteinsequenz mit den Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte unter Verwendung von *CLUSTALW* (LARKIN *et al.* 2007) durchgeführt (Abbildung 3.26). Das Signalprotein besitzt drei wichtige funktionale Domänen, die stark konserviert sind. Dies spricht für die hohe Funktionalität des Signalmoleküls in Säugetieren.

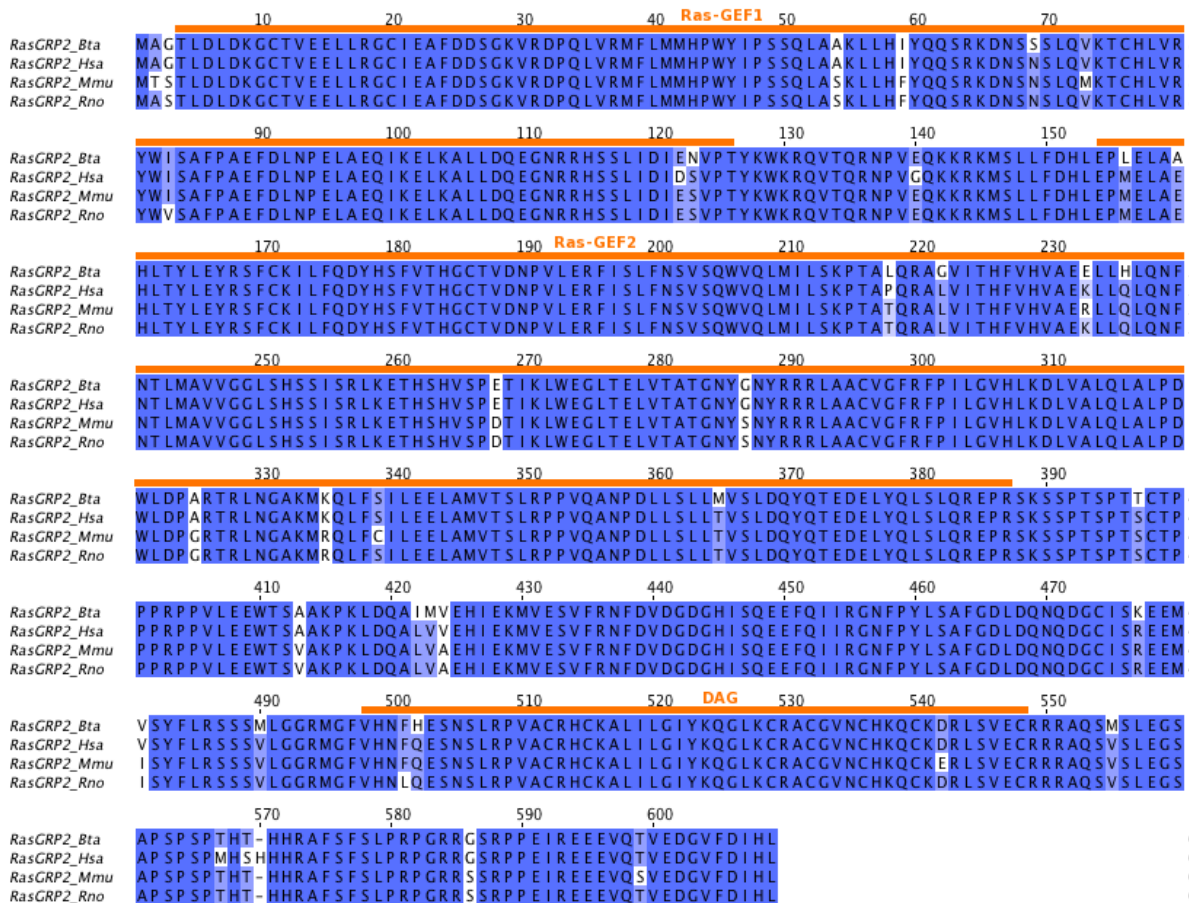


Abbildung 3.26: Multiples Alignment der RasGRP2-Proteinsequenzen verschiedener Spezies

Vergleich der RasGRP2-Proteinsequenzen von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa, NP_0722541), Maus (Mmu, NP_035372) und Ratte (Rno, NP_001076446). Bereiche mit einer Sequenzidentität $\geq 50\%$ sind blau unterlegt. Die Lage der Domänen (Ras-GEF 1-2, DAG) ist, basierend auf Informationen der UniProtKB-Datenbank, orange gekennzeichnet. Die Skala entspricht der Position der Aminosäure im Alignment. Darstellung des Alignments ohne Kennzeichnung der Domänen mit Jalview2 (WATERHOUSE *et al.* 2009).

Die Berechnung der Sequenzidentität und -ähnlichkeit erfolgte mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus. Der Vergleich der RasGRP2-Proteinsequenzen zwischen verschiedenen Spezies konnte zeigen, dass das Protein stark konserviert ist. Die niedrigste Sequenzidentität (94,7 % bzw. 95,2 %) bzw. Sequenzähnlichkeit (97,4 % bzw. 97,7 %) wurden dabei beim Vergleich der bovinen mit den murinen Aminosäuresequenzen beobachtet (Tabelle 3.16). Zwischen dem bovinen Protein und dem menschlichen konnte eine Sequenzidentität von 96,7 % und eine Ähnlichkeit von 98,7 % ermittelt werden. Die sehr starke Konservierung des RasGRP2-Proteins ist ein Hinweis auf die wichtige Funktion des Proteins in der Weiterleitung der Signale im Zellmetabolismus.

Tabelle 3.16: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des RasGRP2-Proteins

<i>Sequenz_1</i>	<i>Sequenz_2</i>	<i>Sequenzidentität (in %)</i>	<i>Sequenzähnlichkeit (in %)</i>	<i>Alignmentlücken (in %)</i>
<i>RasGRP2_Bta</i>	<i>RasGRP2_Hsa</i>	96,7	98,7	0,2
<i>RasGRP2_Bta</i>	<i>RasGRP2_Mmu</i>	94,7	97,4	0,0
<i>RasGRP2_Bta</i>	<i>RasGRP2_Rno</i>	95,2	97,7	0,0

Paarweiser Vergleich der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des RasGRP2-Proteins von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa, NP_0722541) Maus (Mmu, NP_035372) und Ratte (Rno, NP_001076446). Die Berechnung erfolgte mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus (s.o).

3.2.2.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse

Die Re-Sequenzierung des *RasGRP2*-Gens erfolgte aufgrund der hohen Probenanzahl nur in einem Subset, das aus sechs Fällen und sechs Kontrolltieren bestand. Interessant erscheinende SNPs, wie die postulierte p.L234P-Variante, wurden in allen 101 Tieren re-sequenziert. Auf der Suche nach Polymorphismen wurden insgesamt ca. 15 kb re-sequenziert. Diese umfassen das gesamte *RasGRP2*-Gen sowie je ca. 2000 bp der flankierenden Regionen. Insgesamt konnten zwölf variable Nukleotidpositionen identifiziert werden (Tabelle 3.17).

Tabelle 3.17: Übersicht der Polymorphismen von *RasGRP2* in 12 FV-Tieren

<i>SNP_Id</i>	<i>Position</i>	<i>5'- 3' – flankierende Sequenz</i>	<i>Region</i>	<i>Effekt</i>	<i>AS</i>
4259	43.603.564	TGAGGCCCGG [A/C] TCTTTGGGAA	UPSTREAM		
4260	43.603.131	TCCTCTCCAC [C/T] CCAGCCCGCC	UPSTREAM		
4261	43.602.616	CCGCTCCGCC [A/G] GCCTGCGCCT	UPSTREAM		
4262	43.602.507	CTACCCGCGC [C/T] GGC GGCCATG	UPSTREAM		
4263	43.601.279	CAGACACCAT [C/T] CCGCAGATTT	INTRON 2		
4264	43.599.412	CCCACAGCCC [C/T] GCAGCGGGCG	EXON 6	NICHT-SYNONYM	P218L
4265	43.599.378	ACTTCGTCCA [C/T] GTGGCAGAGG	EXON 6	SYNONYM	H229
4266	43.599.204	CCCCAGGAAC [C/T] CCTGCACCTG	EXON 7	NICHT-SYNONYM	L234P
4267	43.598.915	GGAGGCTCAC [A/G] GATGTGCTAA	INTRON 7		
4268	43.591.338	CAGTGGATCT [A/G] GCTGGGCTGC	INTRON 13		
4269	43.591.325	TGGGCTGCCC [A/G] TCTGCCTCCC	INTRON 13		
4270	43.591.189	TACCCACCAT [C/T] GCGCCTTCAG	EXON 14	NICHT-SYNONYM	R572C

Übersicht der durch Re-Sequenzierung identifizierten Polymorphismen des *RasGRP2*-Gens mit 5'- und 3'-flankierenden Regionen in 12 FV-Rindern. Die *SNP_Id* entspricht der internen Identifikationsnummer., die *Position* entspricht der Lokalisation des SNPs auf *BTA29* im *UMD3.1-Assembly*. Die [] enthält das Referenz-Allel und den identifizierten Polymorphismus (fett). Das Referenz-Allel entspricht der Base der bovinen Referenzsequenz. Der Effekt entspricht der Auswirkung des Austauschs auf die Aminosäuresequenz, *AS* ist der Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz mit Positionsangabe

Je vier der entdeckten Polymorphismen waren im 5'-Bereich bzw. in intronischen Bereichen des Gens lokalisiert. Zusätzlich wurden vier Mutationen in kodierenden Regionen des Gens aufgefunden. Bei der Substitution im sechsten Exon handelt es sich um einen synonymen Basenaustausch (C→T; p.H229), der keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz hat. Weiterhin wurden nicht-synonyme Austausche im sechsten (p.P218L) und vierzehnten (p.R572C) Exon identifiziert, die jedoch nur vereinzelt in den untersuchten Tieren vorkommen. Der in der Literatur

beschriebene Polymorphismus im siebten Exon des Gens konnte ebenfalls beobachtet werden (BOUDREAUX *et al.* 2007b). Diese C→T-Substitution im kodierenden Bereich des Gens führt zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch (p.L234P), so dass anstelle eines Leuzins eine Prolin in das Protein eingebaut wird. Diese Mutation wird als kausal für die bovine Form der Thrombozytopathie in Simmental-Rindern des nordamerikanischen Raums beschrieben (BOUDREAUX *et al.* 2007b). Zudem wurden bisher bei verschiedenen Spezies eine Reihe von Mutationen im *RasGRP2*-Gen als Verursacher von Thrombozytenfunktionsstörung genannt (BERGMEIER *et al.* 2007; BOUDREAUX *et al.* 2007a; KILIC und ETZIONI 2009).

Die Re-Sequenzierung der genomischen Region in allen 101 Tieren des Probensets konnte den postulierten Polymorphismus in den betroffenen Tieren mit auffälligen Thrombozytenfunktionstests bestätigen. Diese FV-Rinder tragen die p.L234P-Variante homozygot (Tabelle 3.18). Zehn Tiere ohne oder mit einem uneindeutigen Thrombozytenfunktionstest tragen den C→T-Polymorphismus ebenfalls homozygot. Eine detaillierte Übersicht über den Genotyp jedes einzelnen Tieres wird in Tabelle 9.3 gegeben. Vier Tiere, bei denen sich der BNP-Verdacht nicht bestätigen konnte, wurden ebenfalls an der postulierten Variante re-sequenziert. Alle Fälle tragen den p.L234P-Polymorphismus mindestens heterozygot (Tabelle 3.18).

Tabelle 3.18: Genotypen der p.L234P-Variante der 101 FV-Rinder

<i>Tiergruppe</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Genotyp für p.L234P</i>		
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
betroffene Tiere mit Thrombozytenfunktionstest	44	44	-	-
Kontrolltiere (inklusive 4 Anlageträger)	24	-	6	18
auffällige Tiere ohne bzw. mit uneindeutigem Thrombozytenfunktionstest	29	10	6	13
im Rahmen der BNP-Untersuchung auffällig, aber keine BNP-Tiere, ohne Thrombozytenfunktionstest	4	2	2	-

Genotypen der re-sequenzierten p.L234P-Variante in den 101 FV-Rindern des TCP-Probensets. Der nicht-synonyme Austausch konnte in allen untersuchten Fällen bestätigt werden. Zehn Tiere ohne oder mit einem uneindeutigen Thrombozytenfunktionstest tragen die p.L234P-Variante ebenfalls homozygot.

Der Einfluss der nicht-synonymen-Substitutionen auf die Funktionalität des Proteins wurde mit *PolyPhen-2* (ADZHUBEI *et al.* 2010) bestimmt. Der Aminosäureaustausch an Position 218 des bovinen Proteins hat eine „eventuell schädliche“ Auswirkung auf die Proteinfunktion (Abbildung 3.27 A). Auch die Auswirkung der p.P234L-Mutation auf die Proteinfunktion wird von *PolyPhen-2* als „eventuell schädlich“ vorhergesagt (Abbildung 3.27 B). SIFT (NG und HENIKOFF 2001) bestätigt die vorhergesagten Ergebnisse. Bei einem Vergleich von 399 Proteinsequenzen werden beide Varianten (p.P218L, p.L234P) als nicht-tolerierbar eingestuft. Die R572C-Mutation wird von *PolyPhen-2* als „wahrscheinlich schädlich“ eingestuft (Abbildung 3.27 C). Diese Variante kommt in den untersuchten Tieren des Probensets jedoch nicht homozygot vor.



Abbildung 3.27: Vorhersage der Auswirkung der nicht-synonymen Polymorphismus auf die Funktion des bovinen RasGRP2-Proteins

Die Vorhersage wurde mit *PolyPhen-2* (ADZHUBEI *et al.* 2010) durchgeführt. Die Auswirkung einer Mutation wird basierend auf Paaren der Falsch-Positiv-Rate (FPR) beurteilt und in drei Kategorien eingeteilt: gutartig (benign), eventuell schädlich (possibly damaging) und wahrscheinlich schädlich (probably damaging).

3.2.3 TaqMan®-Genotypisierung der p.L234P-Variante

Zur Überprüfung des Aminosäureaustausches wurde die Variante in insgesamt 2492 Rindern mittels TaqMan®-Assay genotypisiert. Das Probenset der 2492 Rinder setzte sich aus 1930 Fleckvieh-Tieren, 282 Holstein-Friesian und 280 Rindern der Rasse Braunvieh zusammen. 2 Fleckvieh-Tiere tragen den Polymorphismus homozygot (CC), 241 sind heterozygote Träger der Mutation und 1687 Tiere tragen das Wildtyp-Allel (TT). Daraus ergibt sich eine Allelfrequenz der c.T911C-Mutation in der Fleckvieh-Population von 6,35 %. Die untersuchte Variante segregiert nicht bei Rindern der Rasse Braunvieh und Holstein-Friesian (Tabelle 3.19).

Tabelle 3.19: Genotypen der Punktmutation (c.T911C, p.L234P) in RasGRP2 für 2492 Rinder

Rasse	Tiergruppe	Anzahl	Genotyp für c.T911C		
			CC	CT	TT
FV	zufällig selektierte Tiere	1930	2	241	1687
HF	zufällig selektierte Tiere	281	-	-	281
BV	zufällig selektierte Tiere	280	-	-	280

Die Genotypen für die Punktmutation wurden mittels TaqMan®-Genotypisierung für insgesamt 2492 Tiere ermittelt. Zwei Tiere tragen die Mutation homozygot, 241 heterozygot und 1687 FV-Tiere tragen den Polymorphismus nicht. Bei Rindern der Rasse Holstein-Friesian (HF) und Braunvieh (BV) segregiert die Variante nicht.

3.2.4 Genomweite Assoziationsstudie

46 FV-Rinder des Probensets (32 Fälle und 14 Tiere ohne oder mit uneindeutigem Thrombozytenfunktionstest) sowie 3305 gesunde Fleckvieh-Bullen wurden mit dem bovinen HD BeadChip von Illumina genotypisiert. Unter Verwendung eines gemischten linearen Modells wurde eine genomweite Assoziationsstudie des Krankheitsstatus für 660.817 SNPs durchgeführt.

Insgesamt erfüllten 493 SNPs auf Chromosom 29 den Bonferroni-korrigierten Schwellenwert ($P = 7,57 \times 10^{-8}$) für genomweite Signifikanz (Abbildung 3.28). Die stärkste Assoziation ($P = 4,88 \times 10^{-96}$) wurde für ARS-BFGL-NGS-38732, lokalisiert bei 41.664.361 bp, beobachtet.

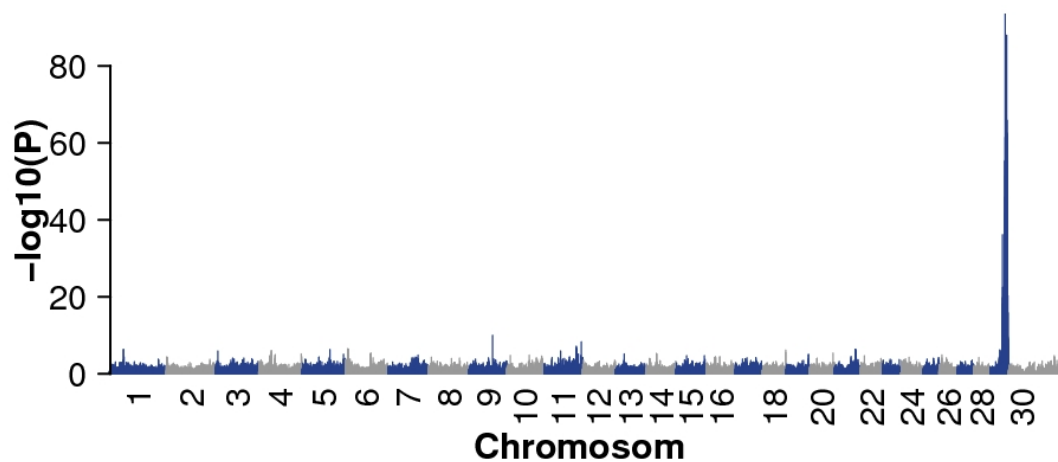


Abbildung 3.28: Assoziation von 660.817 SNPs und 46 TCP-Tieren vs. 3305 Kontrolltieren mit dem Krankheitsphänotyp.

Die genomweite Assoziationsstudie für 660.817 SNPs und 46 FV-Tieren (32 Fälle und 14 Tiere ohne oder mit uneindeutigem Thrombozytenfunktionstest) gegen 3305 Kontrolltiere konnte eine starke Assoziation ($P = 4,88 \times 10^{-96}$) auf BTA 29 feststellen. Die physikalische Position nach dem UMD3.1 Assembly ist auf der x-Achse, der negative dekadische Logarithmus der P-Werte auf der y-Achse aufgetragen.

3.2.5 Identifizierung der krankheitsassoziierten Region

Die Autozygotiekartierung der assoziierten Region auf BTA29 konnte für die 32 betroffenen Tiere mit auffälligem Thrombozytenfunktionstest ein 2098 kb langes, homozygotes Segment (41.968.900 bp – 44.067.207 bp) identifizieren, das aus insgesamt 439 SNPs (BovineHD2900012672 - BovineHD2900013183) des bovinen HD BeadChips besteht (Abbildung 3.29).

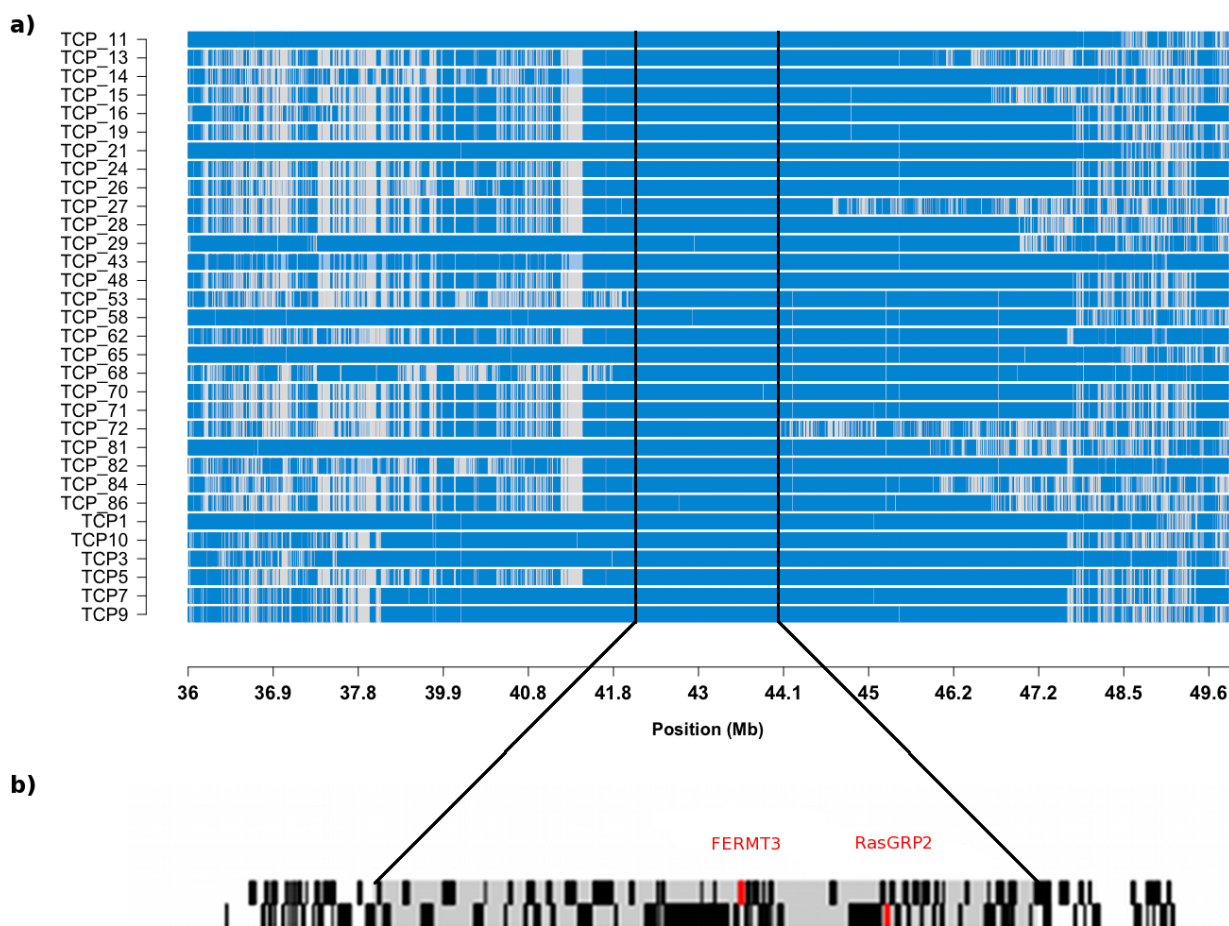


Abbildung 3.29: Darstellung der Genotypen von 32 Tieren des Probensets auf BTA29 (36 Mb - 50 Mb)

a) Homozygote Genotypen sind in blau dargestellt, heterozygote in grau. Der identische, homozygote Bereich (41.968.900 bp – 44.067.207 bp) der betroffenen Tiere wird durch die schwarzen Balken eingegrenzt. b) Gengehalt des homozygoten Bereichs (grau unterlegt) mit flankierenden Regionen. Die Lage der beiden untersuchten Gene (RasGRP2 und FERMT3) ist rot hervorgehoben.

Von den insgesamt 10.336 FV-Tieren, die in die Untersuchung des Haplotypen eingegangen sind, konnten 11 homozygote und 1409 heterozygote Träger des prädisponierenden Haplotyps identifiziert werden. Daraus ergibt sich eine Frequenz dieses Haplotypen von 6,92 % in der Deutschen

FV-Population. Acht Tiere (TCP_35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 50) mit fehlender Thrombozytenaggregationsmessung tragen den prädisponierenden Haplotypen ebenfalls homozygot (Abbildung 3.30). Auffällig ist hierbei, dass zwei Tiere (TCP_38, 40) den Haplotypen auf eine Länge von 1407 kb (41.968.900 bp – 43.375.960 bp) begrenzen, *RasGRP2* liegt nicht mehr innerhalb dieser Region. TCP_38 trägt die *RasGRP2*-Variante nur heterozygot (CT).

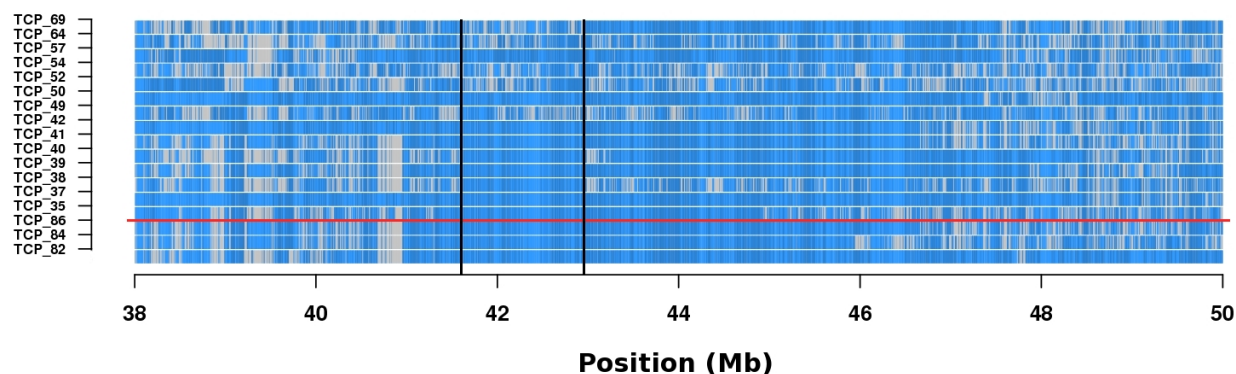


Abbildung 3.30: Darstellung der Genotypen von 14 fraglichen Fällen des Probensets auf BTA29 (38 Mb – 50 Mb)

Homozygote Genotypen sind in blau dargestellt, heterozygote in grau. Tiere unterhalb der roten Linie haben eine auffällige Thrombozytenaggregationsmessung, Tiere überhalb der roten Linie haben keine oder eine uneindeutige Thrombozytenaggregationsmessung. Acht der Tiere ohne oder mit uneindeutiger Thrombozytenaggregationsmessung tragen den prädisponierenden Haplotypen ebenfalls (TCP_35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 50), zwei dieser Tiere grenzen den Haplotypen auf 1407 kb (41.968.900 bp – 43.375.960 bp) ein. Der verkürzte, homozygote Bereich wird durch die schwarzen Balken eingegrenzt.

Innerhalb des 2098 kb langen Haplotypenblocks befinden sich ~70 Gene (Tabelle 9.7), darunter *RasGRP2* und mehrere, die in der Blutgerinnungskaskade eine wichtige Funktion übernehmen.

Zwei der hier lokalisierten Gene, *FERMT3* und *PLCB3*, spielen, ähnlich wie *RasGRP2*, eine wichtige Rolle in der primären Hämostase (siehe Abbildung 9.2). Veränderungen der Proteinfunktionen aufgrund von Mutationen innerhalb dieser Gene können die Bildung blutstillender Thromben stark beeinträchtigen (LIAN *et al.* 2005; SVENSSON *et al.* 2009; KUIJPERS *et al.* 2009).

Neben Genen, die einen offensichtlichen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation haben, liegt innerhalb der homozygoten Region auch ein Gen (*VEGFB*), das an der Formation der Blutgefäße beteiligt ist. Mitglieder der VEGF-Familie (vascular endothelial growth factor) sind wichtige Regulatoren der Blutgefäßbildung (TAMMELA *et al.* 2005; HAGBERG *et al.* 2010) und können positiv auf die Expression und Aktivität von Plasminogenaktivatoren einwirken. Durch die Spaltung von Plasminogen in seine aktive Form Plasmin, das ein Gegenspieler von Thrombin in der Blutgerinnungskaskade ist, nehmen sie Einfluss auf die Thrombolysen (OLOFSSON *et al.* 1998).

3.2.6 Analyse des *FERMT3*-Gens

FERMT3 (fermitin family member 3), auch *Kind-3* genannt, kodiert ein Mitglied der Kindlin-Proteinfamilie (JURK *et al.* 2010). Da Kindlinproteine keine enzymatische Aktivität besitzen, geht man davon aus, dass sie sowohl als Adaptermoleküle fungieren sowie an der Stützfunktion des Zytoskeletts beteiligt sind (BOUAQUINA und CALDERWOOD 2011). Weiterhin sind sie wichtige Vermittler der Integrinsignaltransduktion (Abbildung 9.2) (BÖTTCHER *et al.* 2009).

Kindlin-3, das von *FERMT3* kodierte Protein, wird hauptsächlich in Milz, Thymus, Lymphknoten und diversen Zellen des Immunsystems (T- & B-Zellen, Makrophagen) sowie in hämatopoetischen Zellen exprimiert (MEVES *et al.* 2009; MALININ *et al.* 2010). Mutationen in *FERMT3* beeinflussen die Bindung bzw. Aktivierung des Integrin α 2 β 3-Rezeptors in Thrombozyten und Leukozyten. Bedingt durch die gestörte Signaltransduktion kommt es in betroffenen Individuen zu einer Beeinträchtigung der primären Hämostase sowie der Leukozyten-vermittelten Immunantwort (MORY *et al.* 2008; ZIMMERMAN 2009; ETZIONI 2010; VAN DE VIJVER *et al.* 2012).

Untersuchungen verschiedener Gerinnungsstörungen beim Menschen konnten durch eine Erhöhung der Probandenzahl feststellen, dass Varianten in *RasGRP2* oftmals nicht die ursächlichen Mutationen sind, sondern mit kausalen Varianten in *FERMT3* gekoppelt sind (SVENSSON *et al.* 2009). Daher wurde *FERMT3* im Rahmen dieser Dissertation molekulargenetisch untersucht.

Mittels einer BLAST-Suche konnte das bovine *FERMT3*-Gen auf Chromosom 29 (43.126.406 bp -43.145.363 bp) lokalisiert werden. Basierend auf der *GenomeThreader*-Annotation konnten 15 Exons identifiziert werden (Abbildung 3.31), die ein Transkript von 2522 bp kodieren.

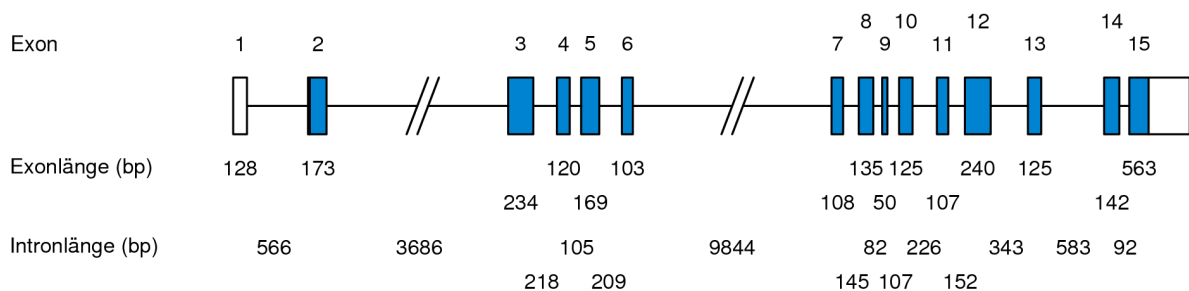


Abbildung 3.31: Graphische Darstellung der Genstruktur von *FERMT3*

Kodierende Sequenzbereiche sind blau, untranslatierte Bereiche weiß und intronische Bereiche durch schwarze Balken dargestellt. Zusätzlich ist die Exon- und Intronlänge basierend auf UMD3.1-Assembly-Informationen in Basenpaaren (bp) angegeben. Intron 2 und Intron 6 wurden bei der Visualisierung aufgrund ihrer Länge verkürzt dargestellt.

Das translatierte Protein hat eine Länge von 665 Aminosäuren. Sowohl in dem bovinen als auch im humanen Transkript befindet sich der Translationsstart im zweiten Exon, das Stoppcodon liegt im letzten Exon. Das humane Protein besitzt zwei Isoformen, die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Die längere Isoform besitzt eine aus fünf Aminosäuren bestehende Insertion in der FERM-Domäne. Die detaillierte Intron-Exon-Organisation des Gens mit Positionsangaben im UMD3.1-Assembly wird in Tabelle 3.20 aufgeführt.

Tabelle 3.20: Intron-Exon-Organisation des FERMT3-Gens in UMD3.1

Nr.	Exonlänge (bp)	Position in cDNA	Position BTA 29 ^{b)}	3' Spleißakzeptor ... 5' Spleißdonor ^{a)}	Nr.	Intronlänge (bp)
1 ^{c)}	128	1 – 128	43.126.406 – 43.126.533	tgaagGAAAC ... GCAAGgtaag	1	566
2	173	129 - 301	43.127.100 - 43.127.272	ctcagCGCCG ... GATCGgtgag	2	3686 ^{e)}
3	234	302 - 535	43.130.959 – 43.131.192	cgcagAACGC ... CCTCAGtgag	3	218
4	120	536 - 655	43.131.411 – 43.131.530	ctcagGTATC ... CGGGGgtgag	4	105
5	169	656 - 824	43.131.636 – 43.131.804	tccagGCGTG ... AGCAGgtgag	5	209
6	103	825 - 927	43.132.014 – 43.132.116	tccagGTGGC ... CCAAGgtggg	6	9844
7	108	928 - 1035	43.141.961 – 43.142.068	tccagACAGA ... TACAGgtgct	7	145
8	135	1036 - 1170	43.142.214 – 43.142.348	tccagTACCA ... TGCTGgtgag	8	82
9	50	1171 - 1220	43.142.431 – 43.142.480	cccagGACAG ... TTCCGgtggg	9	107
10 ^{d) g)}	125	1221 - 1345	43.154.773 - 43.154.648	ctcagGCCCC ... CAAGGgtgag	10	226
11 ^{g)}	107	1346 - 1452	43.154.420 – 43.154.315	tccagGCTGT ... AGGATgtgag	11	152
12 ^{g)}	240	1453 - 1692	43.154.161 – 43.153.922	cccagGAGCA ... AGCAGgtgag	12	343
13 ^{g)}	125	1693 - 1817	43.153.577 – 43.153.453	tgcagCTCAC ... GTCAGgtagg	13	583
14 ^{g)}	142	1818 - 1959	43.152.875 – 43.152.720	accagGTTCA ... GGCAGgtggg	14	92
15 ^{d) g)}	563	1959 - 2522	43.152.636 – 43.152.073	cacagGTGGC ... TCATCctct		

a) Intronische Bereiche sind durch Kleinbuchstaben, exonische Bereiche durch Großbuchstaben gekennzeichnet, die Spleißseiten sind fett unterlegt; basierend auf GenomeThreader Annotation

b) Position basierend auf *Bos taurus* UMD3.1-Assembly,

c) Exon enthält Startcodon,

d) Exon enthält Stoppcodon

e) intronische Sequenz enthält Bereiche mit unbekannter Information,

f) 5'-Position aufgrund von fehlender Sequenzinformation im UMD3.1-Assembly errechnet, basierend auf Re-Sequenzierung und de novo GenomeThreader-Annotation,

g) UMD3.1-Assemblyfehler; Exon 10-15 liegen auf dem komplementären Strang

Die Vorhersage des Transkriptionsstarts mit der *Neural Network Promoter Prediction*-Software war aufgrund von lückenhaften Sequenzinformationen im 5'-Bereichs des Gens nicht möglich. Erst nach der Re-Sequenzierung dieser Region konnte eine Vorhersage durchgeführt werden. Obwohl durch die Re-Sequenzierung nur ein kleiner Teil der unbekannt Sequenz entschlüsselt werden konnte, ergab die Untersuchung der genomischen Sequenz einen wahrscheinlichen Transkriptionsstart mit einem Genauigkeitswert von 0,82. Die vorhergesagte Region liegt ca. 1000 bp vor dem Translationsstart und ~300 bp vor dem ersten Exon (Abbildung 3.32).

Genauigkeit
0,82 CCAGGTCCCTAAATAAACCCAGATCTCATCCTTACAATGCCACTGCTCTTG

Abbildung 3.32: Vorhersage der Promotorsequenz des FERMT3-Gens

Der vorhergesagte Transkriptionsstart ist schwarz markiert, promotorspezifische Elemente sind grau umrandet. Der Genauigkeitswert gibt die Vorhersagegenauigkeit an, mit 0 als Minimum und 1 als Maximum (Reese, 2001).

Zur Evaluierung möglicher CpG-Inseln wurde das 5'-Ende des bovinen *FERMT3*-Gens mit *CpGplot* untersucht. Die Suche nach möglichen CpG-Inseln erbrachte keine Resultate.

Für die Suche nach möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen mit *ConSite* wurden die 5'-Bereiche der bovinen und humanen *FERMT3*-Sequenz aligniert und hinsichtlich ihrer Konservierung auf das Vorhandensein von TFBS überprüft. Bei einem Konservierungsgrad von > 80 % konnten keine TFBS entdeckt werden.

Die Konservierung der Aminosäuresequenz des Proteins wurde über ein multiples Sequenzalignment der bovinen mit den beiden menschlichen Isoformen sowie der Proteinsequenz von Maus und Ratte unter Verwendung von *CLUSTALW* (LARKIN *et al.* 2007) durchgeführt (Abbildung 3.33).

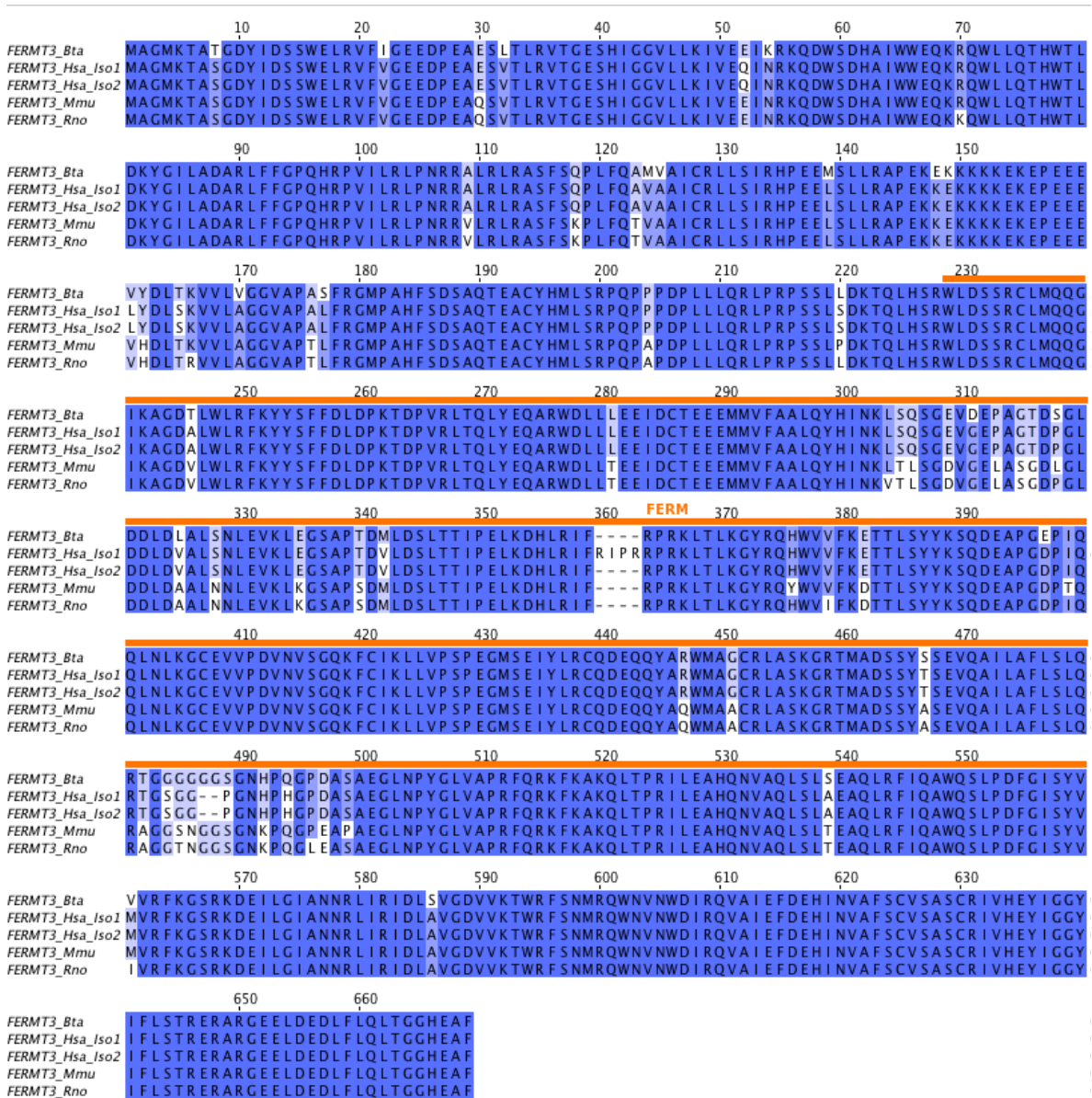


Abbildung 3.33: Multiples Alignment der FERMT3-Proteinsequenzen verschiedener Spezies

Vergleich der FERMT3-Proteinsequenzen von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa-Iso1 und Hsa-Iso2, NP_848537, NP_113659), Maus (Mmu, NP_722490) und Ratte (Rno, NP_001121015). Bereiche mit einer Sequenzidentität $\geq 50\%$ sind blau unterlegt. Die Lage der FERM-Domäne (FERM) ist, basierend auf Informationen der UniProtKB-Datenbank, orange gekennzeichnet. Die Skala entspricht der Position der Aminosäure im Alignment. Darstellung des Alignments ohne Kennzeichnung der Domänen mit Jalview2 (WATERHOUSE et al. 2009).

Die Sequenzidentität und -ähnlichkeit wurde mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus festgestellt. Der Vergleich der FERMT3-Proteinsequenzen verschiedener Spezies konnte zeigen, dass das Protein stark konserviert ist. Zwischen der murinen und der bovinen Sequenz konnte eine

Identität von ~92 % und eine Ähnlichkeit von ~96 % ermittelt werden. Beim Vergleich der menschlichen Proteinsequenz mit der Rindersequenz wurde eine Sequenzidentität von 94,9 % beobachtet (Tabelle 3.21). Die Funktionalität des Proteins in der Aktivierungskaskade der Thrombozyten und Leukozyten ist eine Erklärung für den hohen Konservierungsgrad des Proteins innerhalb der Säugetiere.

Tabelle 3.21: Übersicht der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des FERMT3-Proteins

<i>Sequenz_1</i>	<i>Sequenz_2</i>	<i>Sequenzidentität (in %)</i>	<i>Sequenzähnlichkeit (in %)</i>	<i>Alignmentlücken (in %)</i>
<i>FERMT3_Bta</i>	<i>FERMT3_Hsa_Iso1</i>	95,5	98,0	0,3
<i>FERMT3_Bta</i>	<i>FERMT3_Hsa_Iso2</i>	94,9	97,5	0,9
<i>FERMT3_Bta</i>	<i>FERMT3_Mmu</i>	92,6	96,2	0,0
<i>FERMT3_Bta</i>	<i>FERMT3_Rno</i>	92,5	96,5	0,0

Vergleich der Sequenzidentität und -ähnlichkeit des FERMT3-Proteins von Rind (Bta) mit der Proteinsequenz von Mensch (Hsa-Iso1 und Hsa-Iso2, NP_848537, NP_113659), Maus (Mmu, NP_722490) und Ratte (Rno, NP_001121015). Die Berechnung erfolgte unter Anwendung des Needleman-Wunsch-Algorithmus (s.o.).

3.2.6.1 Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse

Die Re-Sequenzierung des *FERMT3*-Gens erfolgte aufgrund der hohen Probenanzahl nur in einem Subset, das aus sechs Fällen und sechs Kontrolltieren bestand. Interessant erscheinende SNPs wurde in allen 101 Tieren re-sequenziert. Auf der Suche nach variablen Positionen wurden insgesamt ca. 9,5 kb der genomischen Sequenz von *FERMT3* re-sequenziert. Dies umfasste den gesamten kodierenden Bereich des Gens, die 5'- und 3'-flankierenden Regionen sowie einige intronische Bereiche. Aufgrund der Größe wurden das erste und sechste Intron nur an den 5'- bzw. 3'-Enden re-sequenziert. Bei einer ersten BLAST-Suche konnten nur neun der fünfzehn Exons lokalisiert werden. Erst nach eingehender Analyse konnten die fehlenden Exons in falscher Orientierung im Genom entdeckt werden. Ein Teil des zehnten Exons war aufgrund von Lücken in der genomischen Sequenz erst durch die Re-Sequenzierung zu identifizieren. Insgesamt konnten 15 Substitutionen entdeckt werden (Tabelle 3.22). Vier befanden sich im 5'-Bereich des Gens, neun Austausche lagen in den intronischen Bereichen und eine Mutation konnte im 3'-Bereich identifiziert werden. Zusätzlich konnte ein A→G-Polymorphismus im nicht-kodierenden Bereich des ersten Exons von *FERMT3* lokalisiert werden. Keine der gefundenen Substitutionen ist spezifisch für die betroffenen Tiere. Daher können alle identifizierten Austausche als nicht-kausal für den beschriebenen Phänotyp angenommen werden.

Tabelle 3.22: Übersicht der Polymorphismen des FERMT3-Gens in 12 FV-Tieren

<i>SNP_Id</i>	<i>Position</i>	<i>5'- 3' – flankierende Sequenz</i>	<i>Region</i>	<i>Effekt</i>	<i>AS</i>
4271	43.125.232	ACAGGAGTGA [C/G] CCTCATGGGC	UPSTREAM		
4272	43.125.269	AAGTAGAAGG [A/G] CAGAGGGAGG	UPSTREAM		
4273	43.125.303	GACGAGACTT [C/G] AAGGCGTGGG	UPSTREAM		
4274	43.126.069	TGACCTGCCA [G/T] GTCCCTAAA	PROMOTOR		
4275	43.126.425	AAGAGAAAGC [A/G] GAGGGGGAGG	EXON 1		
4276	43.127.556	CATTCTGGGG [G/-] TCAAGGGGAG	INTRON 2		
4277	43.130.942	TGACATGGTC [A/G] CCCTTGGGCC	INTRON 2		
4278	43.132.143	AGAAGGGAGG [C/T] TGGGTTGTGG	INTRON 6		
4279	43.132.158	TTGTGGGACA [C/T] GGGGGATCTC	INTRON 6		
4280	43.141.875	CAGGTCGGGC [C/T] GAGGCCGGAG	INTRON 6		
4281	43.142.179	AATGGGCTGC [C/T] GGCTTAGCCA	INTRON 7		
4282	43.153.443	GGTAGGAGCC [C/T] CACCCCAGCC	INTRON 13		
4283	43.153.394	CTGCCTGGGG [G/-] CAGCGTGTGA	INTRON 13		
4284	43.153.326	CGTGCACTCC [C/T] TCCATCCTGC	INTRON 13		
4288	43.152.912	CATGCAGAGT [A/G] GGGGTGGAGG	INTRON 13		
4286	43.151.559	CAAACCTGGG [C/T] GGGCTGGGAT	DOWNSTREAM		

Übersicht der durch Re-Sequenzierung identifizierten Polymorphismen des RasGRP2-Gens mit 5'- und 3'-flankierenden Regionen in 12 FV-Rindern. Die *SNP_Id* entspricht der internen Identifikationsnummer., die *Position* entspricht der Lokalisation des SNPs auf BTA29 im UMD3.1-Assembly. Die [] enthält das Referenz-Allel und den identifizierten Polymorphismus (fett). Das Referenz-Allel entspricht der Base der bovinen Referenzsequenz. Der Effekt entspricht der Auswirkung des Austauschs auf die Aminosäuresequenz, AS ist der Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz mit Positionsangabe.

3.2.7 Genomweite Re-Sequenzierung und Polymorphismen-Analyse

Durch die genomweite Re-Sequenzierung eines erkrankten Thrombozytopathie-Tieres (TCP_13) sowie 42 krankheitsunauffälligen Tieren, darunter neun heterozygote Haplotypenträger, konnten insgesamt 14.408 polymorphe Positionen (SNPs, Insertionen und Deletionen) in der assoziierten Region auf BTA29 (41.968.900 bp – 44.067.207 bp) identifiziert werden (JANSEN *et al.* 2013).

Da es sich bei dem Phänotyp jedoch nicht um eine letale Erkrankung handelt, können sich auch homozygote Tiere, die nicht als Thrombozytopathen identifiziert wurden, unter den Kontrolltieren befinden und das Auffinden der kausalen Variante so stark erschweren.

Weiterhin konnte bei der Durchsicht der Genomsequenz des erkrankten TCP-Tieres eine homozygot vorliegende, ~80 kb große Deletion (42.497.478 – 42.577.967 bp) in der assoziierten Region beobachtet werden (Abbildung 3.34). Diese Deletion führt zu dem Verlust von zwei

Genen (*LOC614402* und *LOC100336631*), welche die beiden Phospholipase A2, Gruppe 16-ähnlichen Proteine kodieren. Zudem ist nicht ausgeschlossen, dass durch die Deletion der regulatorische Bereich einer weiteren Phospholipase (*PLA2G16*) oder die transkriptionelle Regulation des *RasGRP2*-Gens beeinträchtigt wird, da regulatorische Bereiche oftmals mehrere Kilobasen vor den kodierenden Sequenzbereichen eines Gens lokalisiert sein können (z.B. (TROELSEN *et al.* 2003)).

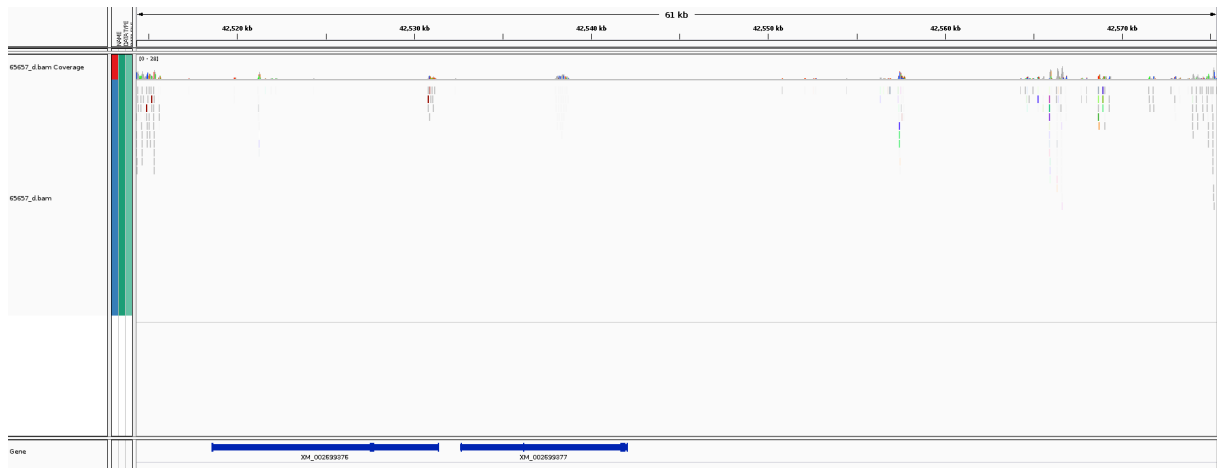


Abbildung 3.34: ~ 80 kb Deletion in TCP_13

Die Visualisierung der Daten der genomweiten Re-Sequenzierung erfolgte mittels IGV (integrative genomics viewer; <http://www.broadinstitute.org/igv/>). Dargestellt ist die ~80 kb umfassende, homozygot vorliegende Deletion in dem re-sequenzierten TCP-Tier (TCP_13).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Feinkartierung und Bestimmung der kausalen Varianten von zwei seit Kurzem in der Deutschen Fleckvieh-Population auftretenden Erbkrankheiten. Durch die Verwendung modernster molekulargenetischer Untersuchungsmethoden war es möglich, die zugrunde liegenden Vererbungsmuster aufzudecken und die genomischen Regionen einzugrenzen.

4.1 BHZD-ähnliches Syndrom

Acht Kälber mit entzündeten Hautveränderungen und einem schlechten Allgemeinzustand wurden in der Deutschen Fleckvieh-Population identifiziert. Die klinischen und pathologischen Untersuchungen der betroffenen Kälber zeigten eine auffällige Ähnlichkeit zu Untersuchungsbe-
funden von Kälbern, die an einer Zinkmalabsorptionsstörung leiden (STÖBER 1971; TRAUTWEIN 1971; MACHEN *et al.* 1996).

Eine erbliche Variante des bovinen Zinkmalabsorptionssyndroms ist bei Rindern der Rasse Holstein-Friesian mit einer Mutation im *SLC39A4*-Gen assoziiert (YUZBASIYAN-GURKAN und BARTLETT 2006). *SLC39A4* gehört zur Familie der ZIP-Transporter, deren Funktion der Transport von Zink und anderen zweiwertigen Ionen ist und so den intrazellulären Zinkgehalt durch aktiven Transport in das Zytoplasma erhöhen (LIUZZI und COUSINS 2004). Die Expression des Gens wird, basierend auf der An- bzw. Abwesenheit von Zink, posttranskriptional gesteuert, wobei die genauen Mechanismen bisher noch nicht geklärt werden konnten (ANDREWS 2008). *SLC39A4* wird hauptsächlich in Gastrointestinaltrakt exprimiert und ist dort für die Absorption des Spurenelements aus der Nahrung verantwortlich. Bisher wurden erbliche Zinkmangelkrankungen bei verschiedenen Spezies wie Mensch, Maus und Rind beschrieben (KÜRY *et al.* 2002; WANG *et al.* 2004; YUZBASIYAN-GURKAN und BARTLETT 2006; DUFNER-BEATTIE *et al.* 2007). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Ursache der erblichen Störung Mutationen im *SLC39A4*-Gen sind. Für den Menschen wurden über 30 verschiedene Mutationen innerhalb des Transportergens beschrieben, die als kausal für den Krankheitsphänotyp gelten (KÜRY *et al.* 2003). Aufgrund der schon postulierten Variante in Rindern der Rasse Holstein-Friesian wurde *SLC39A4* als Kandidatengen für die Erkrankung in Betracht gezogen und analysiert. Durch die molekulargenetische Untersuchung des Gens konnte kein Polymorphismus entdeckt werden, der das Krankheitsbild der betroffenen FV-Kälber erklären würde. Die Symptomatik erblicher Zinkabsorptionsstörungen die auf Mutationen in *SLC39A4* beruhen, kann durch die Einnahme hochdosierter Zinkpräparate

gelindert werden (BRUMMERSTEDT 1977). Die betroffenen FV-Kälber zeigten nach der Gabe von hochdosiertem Zink jedoch keine Verbesserung der Symptome. Es ist daher davon auszugehen, dass *SLC39A4* nicht ursächlich für den FV-spezifischen Phänotyp ist.

Die im Anschluss durchgeführte genomweite Assoziationsstudie konnte eine starke Assoziation ($P = 5,87 \times 10^{-89}$) für BTA21 aufdecken. Für BTA14, auf dem *SLC39A4* lokalisiert ist, wurde keine Assoziation mit dem Phänotyp gefunden. Innerhalb der assoziierten Region auf BTA21 (1023 kb) befinden sich 25 verschiedene Gene, unter anderem zwei Zinktransporter-kodierende Gene (*CRIP1*, *CRIP2*). Obwohl beide Proteine eine hohe funktionale Ähnlichkeit zum *SLC39A4*-Transporter aufweisen (O'DELL 1992; COUSINS 2010), konnten bei der molekulargenetischen Untersuchung der beiden Gene keine Mutationen entdeckt werden, welche das Krankheitsbild verursachen würden. Es ist daher zu vermuten, dass es sich, ähnlich wie bei der Spinnengliedrigkeit (DRÖGEMÜLLER *et al.* 2010; BUITKAMP *et al.* 2011), um eine Erkrankung mit einer heterogenen genetischen Ursache handelt.

Die Analyse der genomweiten Re-Sequenzierung konnte eine Punktmutation in *PLD4* nachweisen, einem Mitglied der nicht-klassischen Phospholipase D-Familie (YOSHIKAWA *et al.* 2010), die zu der Entstehung eines beschädigten Proteins führt. Alle betroffenen Kälber tragen diese Variante homozygot. Durch den G→A-Polymorphismus im sechsten Exon des Gens kommt es zu dem frühzeitigen Einbau eines Stoppcodons (p.W215X) und damit zur Termination der Translation, wodurch das entstehende Protein um 256 Aminosäuren verkürzt wird. Es ist anzunehmen, dass der Basenaustausch einen gravierenden Einfluss auf die Proteinfunktion hat (DAMÉ *et al.* 2012; PIRET *et al.* 2012; MORY *et al.* 2012). Transkripte, die durch eine Mutation ein verfrühtes Stoppcodon tragen, können durch Mechanismen des Nonsense-vermittelten-mRNA-Abbaus (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD) vor der Translation abgebaut werden (FRISCHMEYER und DIETZ 1999; CAVANAGH *et al.* 2007), da sie bei ihrer Übersetzung zu verkürzten Proteinen führen, die in einem Verlust (*loss-of-function*) oder einem schädlichen Zugewinn (*gain-of-function*) der Proteinfunktion resultieren können (PERROTTA *et al.* 2010; LONG *et al.* 2010; WONG *et al.* 2012). Der tatsächliche Einfluss des identifizierten W215X-Polymorphismus auf die Transkription und Expression des Gens ist noch nicht bekannt und muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Bisher ist nur wenig über die enzymatische Funktion des Proteins bekannt. In Mäusen wird *PLD4* vorrangig in der Milz und in frühen, postnatalen Mikorglia (inflammatorische Zellen des

zentralen Nervensystems) exprimiert (YOSHIKAWA *et al.* 2010; OTANI *et al.* 2011). Die Expression des Proteins in der Randzone der Milz unterstützt die Hypothese einer funktionalen Beteiligung der Phospholipase am Immunsystem (TERAO *et al.* 2012). Mäuse mit einer Mutation in dieser Phospholipase manifestieren einen Phänotyp mit dünnem Haar und einem verzögerten Wachstum (HARRIS *et al.* 2011). Genomweite Assoziationsstudien beim Menschen konnten eine Verbindung zwischen *PLD4*-Varianten und rheumatoider Arthritis bzw. systemischer Sklerose nachweisen (OKADA *et al.* 2012; TERA0 *et al.* 2012). Charakteristisch für beide Erkrankungen ist eine Beeinträchtigung des Immunsystems (Autoimmunerkrankungen) und der inneren Organe, wie Herz, Lunge und Darm (McINNES und SCETT 2011; CHIZZOLINI *et al.* 2011). Die systemische Sklerose prägt sich zudem durch fibröse Veränderungen der Haut aus, die zu entzündlichen Hautläsionen führen (O'REILLY *et al.* 2012). Weiterhin kommt es bei beiden Krankheiten noch vor der Manifestation der offensichtlichen Hautläsionen und Entzündungen zu dem vermehrten Auftreten interstitieller Lungenerkrankungen (SWARTZ *et al.* 2010; HAMBLIN und HORTON 2011; PICCHIANTI DIAMANTI *et al.* 2011; BUSSONE und MOUTHON 2011). Die Ähnlichkeit in der Ausprägung der Erkrankungen beim Menschen und bei den Fleckvieh-Kälbern spricht für die Kausalität des Gens und der beschriebenen p.W215X-Mutation. Zusätzlich konnten ARUN *et al.* (2013) die Wichtigkeit von Mitgliedern der Phospholipase D-Familie bei der Reparatur von Membranverletzungen muriner Keratinozyten verdeutlichen, was die Rolle dieser Signalezyme für die Membranfunktion und Wundheilung hervorhebt. Zudem identifizierten GRALL *et al.* (2012) eine Mutation in einer Phospholipase, die zu einer Verhornungsstörung bei Hunden führt. Dadurch konnte die Schlüsselrolle dieser Proteine bei der Keratinisierung und den Stoffwechselprozessen der epidermalen Barrierefunktion im Allgemeinen verdeutlicht werden.

Die Überprüfung des Vorkommens der Stoppmutation in einem Probenet bestehend aus drei unterschiedlichen Rinderrassen und insgesamt 2322 Tieren konnte zeigen, dass dieser Polymorphismus nur in den erkrankten Kälbern homozygot vorliegt. Dies ist ein weiteres Indiz für die Kausalität der p.W215X-Variante, da autosomal-rezessive Erkrankungen mit letalem Erbgang ausschließlich in den betroffenen Tieren homozygot auftreten können (BUTKAMP *et al.* 2011; FOXCLIPSHAM *et al.* 2011; KALAY *et al.* 2012). Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass eine beeinträchtigte Funktion der *PLD4* ursächlich für die Hautveränderungen und den schlechten Allgemeinzustand der betroffenen FV-Kälber ist.

Obwohl es große Ähnlichkeiten zwischen dem FV-spezifischen Syndrom und BHZD bei Holstein-Friesian gibt, konnte bisher kein Hinweis auf eine Verbindung der Phospholipase D4 und dem Zinkmetabolismus gefunden werden. Weiterhin konnte die Gabe von hochdosiertem Zink die Symptome der Erkrankung der betroffenen FV-Kälber nicht lindern, was die Vermutung erhärtet, dass der Phänotyp nicht durch eine gestörte Zinkabsorption verursacht wird.

Aufgrund des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums der untersuchten Patienten kann zurzeit nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Erkrankung um einen genetischen Defekt mit unvollständiger Penetranz oder variabler Expressivität handelt. Obwohl es wahrscheinlich ist, dass eine Vielzahl der betroffenen Kälber schon vor der Ausprägung der offensichtlichen dermatologischen Veränderungen den beschriebenen Sekundärinfektionen erliegt, ist es möglich, dass die Manifestation der Erkrankung durch äußere Umstände beeinflusst wird. Eine endgültige Aussage über die Penetranz der Erbkrankheit lässt sich nur durch weitere klinische Studien und die Beobachtung betroffener Tiere von Geburt an und unter kontrollierten Bedingungen treffen.

Zwei gesunde Tiere tragen den prädisponierenden Haplotypen homozygot. Die Überprüfung der *PLD4*-Variante konnte zeigen, dass in keinem dieser Tiere die p.W215X-Mutation homozygot vorliegt. Es ist daher wahrscheinlich, dass der kausale Polymorphismus der Erkrankung der FV-Population in der Keimbahn des Gründertieres entstanden ist, wodurch zwei identische Haplotypen in der Population existieren, die sich nur an dem Defektallel unterscheiden. Eine ähnliche Situation wurde für das Arachnomelie-Syndrom beim Braunvieh beobachtet (DRÖGEMÜLLER *et al.* 2010). Dies schließt die Unterscheidung zwischen Tieren, die den gesunden Haplotypen und Tieren, welche die krankheitsassoziierte Form tragen anhand von Array-basierten Genotypen aus. Da bei der Frequenzberechnung nicht zwischen dem gesunden und dem krankheitsassoziierten Haplotypen unterschieden werden kann, ist die berechnete Frequenz des prädisponierenden Haplotypen (1,86 %) höher als die Frequenz des Defektallels (1,1 %). Dennoch kann der breite Einsatz eines Defektallel-tragenden Zuchtbullen zum sofortigen Anstieg der Frequenz in der Deutschen Fleckvieh-Population führen. Bei einer Frequenz von 1,1 % des Defektallels in der FV-Population, einem gleich verteilten Gebrauch aller Besamungsbullen und ca. 1.100.000 jährlichen Geburten sollten pro Jahr 121 betroffene (homozygote) FV-Kälber geboren werden. Die meisten dieser Fälle werden wahrscheinlich aufgrund der unspezifischen Krankheitssymptome (z.B. Lungen- und Magen-Darm-Erkrankungen) nicht als betroffene Kälber identifiziert und sterben vor der Manifestation des charakteristischen Krankheitsbildes.

Die routinemäßige Genotypisierung aller Zuchtbullen der FV-Population im Rahmen der genomischen Selektion ermöglicht die schnelle Identifizierung von Tieren, die den prädisponierenden Haplotypen tragen. Diese Tiere sollten an der kausalen p.W215X-Variante genotypisiert und Träger aus der künstlichen Besamung ausgeschlossen werden. Dieser kosteneffektive Ansatz würde unnötiges Tierleiden und wirtschaftliche Verluste durch die Vermeidung von Risikoanpaarungen (Anlageträger x Anlageträger) verhindern ohne dabei (große) Auswirkungen auf das Zuchtprogramm zu haben.

4.2 Thrombozytopathie

Im Rahmen der bovinen neonatalen Thrombozytopenie (BNP)-Untersuchungen wurden vermehrt Rinder der Rasse Deutsches Fleckvieh mit starker Blutungsneigung auffällig, deren Blutbilder nicht dem klinischen Bild der BNP entsprachen. Betroffene Tiere hatten in der Regel ein ungestörtes Allgemeinbefinden, litten aber nach Verletzungen der Haut an zum Teil massiven, längerfristigen Blutungen sowie Blutungen der Nase und Schleimhäute.

Bisher wurde eine erbliche Störung der Blutplättchenaggregation nur bei Simmental-Rindern im nordamerikanischen Raum beobachtet (SEARCY *et al.* 1990; STEFICEK *et al.* 1993b; NAVARRE *et al.* 1995). Als Ursache dieser Thrombozytopathie wird eine Punktmutation im Exon 7 des *RasGRP2*-Gens angegeben, die zu einem Aminosäureaustausch (p.L234P) und damit wahrscheinlich zu einer gestörten Funktionalität des Proteins führt (BOUDREAU *et al.* 2007b).

Eine genomweite Assoziationsstudie der betroffenen Tiere konnte eine starke Assoziation ($P = 4,88 \times 10^{-96}$) des Phänotyps mit einer genomischen Region auf BTA29 identifizieren. Dies steht im Widerspruch zu Kreuzungsexperimenten, die vermuten lassen, dass die Krankheit auf Polymorphismen an mindestens zwei unterschiedlichen Genorten beruht (MAPLETOFT *et al.* 2000). Der 2,1 Mb lange homozygote Bereich (41.968.900 bp – 44.067.207 bp) auf Chromosom 29 beinhaltet insgesamt mehr als 70 Gene. Das in der Literatur als ursächlich für eine erbliche Blutgerinnungsstörung bei Simmental-Rindern (HTS) angegebene *RasGRP2*-Gen befindet sich ebenfalls innerhalb dieser Region (BOUDREAU *et al.* 2007b). Alle 44 Tiere mit einer bestätigten Thrombozytenfunktionsstörung tragen das Defektallel homozygot. Zusätzlich tragen zehn Tiere ohne oder mit uneindeutiger Thrombozytenaggregationsmessung diesen Polymorphismus homozygot. Die Autozygotiekartierung der krankheitsassoziierten Region konnte ein 2098 kb langes homozygoten Segment (41.968.900 bp – 44.067.207 bp) für die 32 genotypisierten FV-Tiere identifizieren. Innerhalb dieses Bereichs ist auch das postulierte *RasGRP2*-Gen lokalisiert. Acht Tiere ohne

oder mit uneindeutiger Thrombozytenaggregationsmessung, die aber differentialdiagnostisch auffällig waren, tragen die krankheitsassoziierte Region ebenfalls homozygot. Berücksichtigt man diese Tiere bei der Autozygotiekartierung verkürzt sich der homozygote Bereich auf 1407 kb (41.968.900 bp – 43.375.960 bp), *RasGRP2* liegt nicht mehr innerhalb dieser Region. Es ist unwahrscheinlich, dass Polymorphismen in Genen, die außerhalb eines signifikant assoziierten, homozygoten Bereichs lokalisiert sind, für die Ausprägung eines bestimmten Phänotyps verantwortlich sind (WALSH *et al.* 2010; LITTINK *et al.* 2010; SEICHTER *et al.* 2011). Daher ist es möglich, dass die krankheitsverursachende Mutation nicht die postulierte p.L234P-Variante ist. Um die Kausalität des nicht-synonymen Aminosäureaustausches beurteilen zu können, müssen zusätzliche Fälle untersucht und Studien zum Einfluss der p.L234P-Variante auf die Proteinfunktion durchgeführt werden.

Verschiedene Studien hämorrhagischer Diathesen bei Menschen konnten durch eine Erhöhung der Probandenzahl zeigen, dass die Thrombozytenfunktionsstörung nicht durch Basensubstitutionen in *RasGRP2* ausgelöst werden, sondern Varianten in benachbarten Genen, die ebenfalls an der Blutgerinnungskaskade beteiligt sind, die Blutungsepisoden verursachen (SVENSSON *et al.* 2009; KUIJPERS *et al.* 2009). Obwohl die p.L234P-Variante als schädlich für die Proteinfunktion eingeschätzt wird (siehe Kapitel 3.2.2.1), ist die genaue Wirkung des nicht-synonymen Aminosäureaustausches auf die Thrombozytenaggregation noch nicht detailliert erforscht worden.

Innerhalb der homozygoten Region befinden sich weitere Gene die in der Plättchenaggregation (*FERMT3* und *PLCB3*) sowie bei der Formation der Blutgefäße (*VEGFB*) eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 9.2). Da diesen Genen eine direkte oder indirekte Rolle in der Blutgerinnung zukommt, ist es denkbar, dass Mutationen in diesen Genen in einer Störung der Hämostase resultieren. Untersuchungen einer menschlichen Blutgerinnungsstörung, der Leukozyten-Adhäsions-Defizienz-Typ-III, ließen vermuten, dass Polymorphismen im *RasGRP2*-Gen ursächlich für die Erkrankung sind (PASVOLSKY *et al.* 2007). Erst nach weiteren Untersuchungen konnten Varianten im humanen *FERMT3*-Gen als Ursache der Erkrankung identifiziert werden (SVENSSON *et al.* 2009). Charakteristisch für diese Krankheit sind ausgeprägte Blutungsepisoden aufgrund einer Störung der Integrinrezeptoraktivierung (JURK *et al.* 2010). Durch die Re-Sequenzierung des bovinen *FERMT3* konnten Polymorphismen innerhalb des Gens als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden.

Weiterhin befindet sich innerhalb des homozygoten, chromosomalen Bereichs ein Phospholipase C-kodierendes Gen (*PLCB3*). Durch ihre Rolle in der Signaltransduktion der primären Häm-

stase ist es wahrscheinlich, dass Mutationen im Gen, welche die Funktionalität der Phospholipase einträchtigen oder ganz außer Kraft setzen, in einer Blutgerinnungsstörung resultieren (BANNO *et al.* 1995). Zusätzlich ist in der genomischen Region ein vaskulärer Wachstumsfaktor (*VEGFB*) lokalisiert. Mitglieder der VEGF-Familie sind für die richtige Ausbildung der Blutgefäße von essentieller Bedeutung (KOCH und CLAESSION-WELSH 2012). Da Komponenten der Blutgefäßwände, wie beispielsweise Kollagen (FARNDALE *et al.* 2003), großen Einfluss auf die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade haben, ist eine Störung der Koagulation durch eine veränderte epidermale Struktur gut vorstellbar.

Die genomweite Re-Sequenzierung eines betroffenen Tieres und die anschließende Analyse der identifizierten Polymorphismen konnte keinen SNP innerhalb der Genstruktur dieser Gene entdecken. Jedoch ist die genomische Sequenz von *PLCB3* noch nicht vollständig entschlüsselt, so dass SNPs, aufgrund fehlender Sequenzinformationen, bei der Analyse nicht detektierbar gewesen sein können. Zusätzlich sind, obwohl der genomische Bereich eine durchschnittliche 6,75fache Abdeckung zeigt, einige Regionen des Gens nur sehr wenig bis gar nicht abgedeckt. Dies kann ebenfalls zu einem Nichterkennen variabler Positionen führen.

Darüber hinaus sind in dem genomischen Abschnitt auch eine Reihe anderer Gene lokalisiert, die keinen offensichtlichen Einfluss auf die Blutgerinnung haben. Aufgrund der Komplexität dieses biologischen Prozesses kann nicht ausgeschlossen werden, dass Basensubstitutionen und/oder strukturelle Veränderungen in diesen Genen zu einer bisher unbekanntem Beeinträchtigung der Hämostase führen. Weiterhin konnte innerhalb des homozygoten Bereichs eine ~80 kb große Deletion identifiziert werden. Innerhalb dieser strukturellen Variante sind mindestens zwei Gene lokalisiert. Das genomweit re-sequenzierte TCP-Tier sowie andere Tiere der genomweiten Re-Sequenzierung tragen die Deletion homozygot. Bisher konnte der Einfluss der strukturellen Variante auf den Phänotyp noch nicht geklärt werden, jedoch können große Deletionen, die zum Verlust von Genen führen, für die Manifestation von Krankheiten ursächlich sein (z.B. (PROBST *et al.* 2007; BRUSIUS-FACCHIN *et al.* 2012)).

Die genetische Manifestation der Erkrankung konnte bisher noch nicht bestimmt werden. Es ist bekannt, dass die Ausprägung des Phänotyps bei Blutgerinnungsstörungen sehr variabel sein kann (z.B. (RODEGHIERO und CASTAMAN 2001)). Bei der bovinen Thrombozytopathie kann es von leichtem Nasenbluten bis zu schwerwiegenden inneren Blutungen nach Verletzungen oder Abkalbungen kommen (STEFICEK *et al.* 1993b; WEISSER *et al.* 2010). Dies kann ein Hinweis auf

eine unvollständige Penetranz oder variable Expressivität des genetischen Defekts sein (MARIANI und BERNARDI 2009; LILICRAP 2009; CHAVALI *et al.* 2009). Weiterhin ist der Umwelteffekt auf die Blutgerinnungsstörung noch nicht geklärt. Es ist vorstellbar, dass sowohl die Aufstallung (Verletzungsrisiko) als auch die Fütterung einen Effekt auf die Blutungsneigung betroffener Tiere hat. Darüber hinaus gibt es beim Menschen Hinweise, dass die Ausprägung einer Gerinnungsstörung mit der Blutgruppe des Patienten zusammenhängt (ORSTAVIK *et al.* 1985; HICKSON *et al.* 2010).

Elf Fleckvieh-Bullen tragen den prädisponierenden Haplotypen homozygot, 1409 Fleckvieh-Bullen sind heterozygote Träger des Haplotypen. Die hohe Anzahl an homozygoten Tieren lässt sich durch die große Variabilität in der Ausprägung der Blutgerinnungsstörung erklären. Dadurch ist es möglich, dass auch homozygote Träger der Erkrankung das Reproduktionsalter erreichen und so die Blutungsneigung weiter in der Population verbreiten. Durch das Vorkommen homozygoter Träger des krankheitsassoziierten Haplotyps kann es sich bei der bovinen Thrombozytopathie nicht um einen letalen Erbdefekt handeln (VANRADEN *et al.* 2011). Bei den elf Tieren handelt es sich zum Teil um genomische Jungvererber mit einem hohen genomischen Zuchtwert (> 120). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Bullen in Zukunft gehäuft in der künstlichen Besamung eingesetzt werden, wodurch innerhalb weniger Generationen die Anzahl betroffener Tiere stark ansteigen wird.

Mit einer Frequenz von 6,9 % ist der krankheitsassoziierte Haplotyp stark in der Deutschen Fleckvieh-Population vertreten. Dies kann auf einen möglichen positiven Effekt des Haplotypen auf heterozygote Tiere hinweisen. Eine Mutation im bovinen *TFAM*-Gen führt bei heterozygoten Trägern zu einer verbesserten Fruchtbarkeit und Milchproduktion im Vergleich mit beiden homozygoten Varianten (CLEMPSON *et al.* 2011). Ein ähnlicher Effekt wäre auch bei der vorliegenden Erkrankung denkbar. Dessen ungeachtet kann die Verbreitung des Defekts in der Rinderpopulation auch auf der Struktur der bovinen Zuchtprogramme beruhen. Durch den vermehrten Einsatz einzelner Elitebullen ist es möglich einen autosomal-rezessiven Defekt unbemerkt, großflächig in der Population zu verteilen (WHITLOCK *et al.* 2008).

Durch die genomweite Re-Sequenzierung wichtiger Gründertiere der Deutschen Fleckvieh-Population war es möglich den Ursprung der Erkrankung einzugrenzen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Blutgerinnungsstörung über zwei FV-Bullen, Renner und Radi, in der Population verteilt wurde. Obwohl beide Bullen von Redad (50%-Red Holstein-blutführender Bulle)

abstammen, scheint der Haplotyp nicht über Red Holstein in die FV-Population eingebracht worden zu sein, sondern über einen gemeinsamen Vorfahren der beiden FV-Bullenmütter.

4.3 Die Schwierigkeiten bei der Suche nach kausalen Varianten

Die Ursache einer genetischen Prädisposition aufzudecken erscheint einfach, wenn das Krankheitsbild einer bereits entschlüsselten Erkrankung einer anderen Rasse oder Spezies ähnlich ist. Tatsächlich ist die Übertragbarkeit solcher Ergebnisse oft schwierig, da ein ähnlicher Phänotyp einer Erkrankung bzw. eines Defekts nicht zwingend auf dem gleichen Vererbungsmuster oder der gleichen Krankheitsursache basiert. Man spricht in diesem Fall von Heterogenie (McCLELLAN und KING 2010). Beispielhaft hierfür ist die Spinnengliedrigkeit bei Rindern der Rasse Braunvieh und Fleckvieh. Obwohl der Phänotyp des Defekts bei den betroffenen Rinderrassen identisch ist, konnte gezeigt werden, dass die kausalen Mutationen in verschiedenen Genen lokalisiert sind (DRÖGEMÜLLER *et al.* 2010). Zusätzlich können Phänokopien die Ermittlung einer genetischen Ursache einer Erkrankung behindern, da das gehäufte Auftreten von Phänokopien die Durchführung genomweiter Assoziationsstudien erschwert (AGERHOLM *et al.* 2004; LESCAI und FRANCESCHI 2010). Des Weiteren kann es problematisch sein einen offensichtlichen Zusammenhang zwischen dem kausalen Gen und dem Krankheitsbild herzustellen. Das in der vorliegenden Dissertation identifizierte kausale Gen für das BHZD-ähnliche Syndrom, *PLD4*, ist bisher nur wenig in der Literatur beschrieben worden. Zurzeit gibt es kaum Informationen über die Lokalisation und Funktion der Phospholipase, so dass noch nicht klar ist, wie eine stark eingeschränkte Funktion oder der komplette Funktionsverlust in dem beschriebenen Phänotyp resultieren kann. Zusätzlich können funktional-ähnliche Gene, die in den assoziierten Regionen lokalisiert sind, die Suche nach kausalen Varianten erschweren. Die molekulargenetische Untersuchung des BHZD-ähnlichen Syndroms erfolgte, aufgrund der funktionalen Ähnlichkeit zu dem postulierten Gen bei Rindern der Rasse Holstein-Friesian (YUZBASIYAN-GURKAN und BARTLETT 2006), erst in zwei Zinktransporter-kodierenden Genen, bevor das ursächliche Gen über die genomweite Re-Sequenzierung identifiziert werden konnte. Obwohl in den vergangenen Jahren eine Reihe physiologischer Zusammenhänge aufgedeckt werden konnte, ist nach wie vor eine Vielzahl biologischer Prozesse noch nicht bis in Detail erklärt, so dass die komplexen Zusammenhänge zwischen Kandidatengenen und Krankheiten manchmal nicht auf den ersten Blick ersichtlich sind.

Ein weiteres Problem bei der Entschlüsselung einer neuen Erkrankung ist die Frage nach der genetischen Manifestation. Erbfehler mit unvollständiger Penetranz oder variabler Expressivität zeigen oft einen uneindeutigen Phänotyp, so dass die Diagnose schwierig sein kann. Obwohl gehäuft autosomal-dominante Erbgänge eine unvollständige Penetranz aufweisen, kann die charakteristische Manifestation eines Phänotyps auch bei autosomal-rezessiven Erbgängen variabel sein (GENTILE und TESTONI 2006; JOSS *et al.* 2008).

4.4 Schlussfolgerungen

Wichtig für eine schnelle Aufklärung eines Erbfehlers ist die richtige Zusammenarbeit zwischen Tierärzten und -züchtern. Durch die aufmerksame Beobachtung eingehender Krankheitsfälle und die detaillierte Anamnese mit ersten Stammbaumanalysen ist es möglich, neu auftretende Erbfehler innerhalb einer Population schnell zu identifizieren. Die Zusammenarbeit beider Disziplinen kann die rasche Entschlüsselung der Zusammenhänge zwischen dem Phänotyp und der genetischen Ursache bewirken und somit Tierleiden und wirtschaftlichen Verlusten vorbeugen. Basierend auf der erwarteten Anzahl betroffener Tiere einer genetischen Erkrankung können Entscheidungen zum richtigen Umgang mit der genetischen Prädisposition getroffen werden.

Das BHZD-ähnliche Syndrom ist eine kürzlich entdeckte autosomal-rezessive Erbkrankheit in der Deutschen Fleckvieh-Population, das durch eine verfrühte Stoppmutation (p.W215X) in dem Phospholipase D4-kodierenden Gen (*PLD4*) verursacht wird. Ein Zinkmangel scheint für die Ausprägung der Krankheitssymptomatik nicht ursächlich zu sein. Um die Genotyp-Phänotyp-Interaktion eindeutig entschlüsseln zu können sind weitere Studien notwendig. Die Identifizierung der kausalen Variante ermöglicht das Testen der gesamten FV-Population, so dass ein tiergerechter und kosteneffektiver Umgang mit der erblichen Erkrankung möglich ist. Obwohl die Frequenz des Defektallels zurzeit noch niedrig ist (1,1 %), kann der breite Einsatz eines einzelnen Defektallel-tragenden Bullen die Anzahl betroffener Tiere innerhalb weniger Generationen drastisch erhöhen.

Die identifizierte Blutgerinnungsstörung beim Deutschen Fleckvieh ist eine Krankheit, die schon bei Simmental-Rindern im nordamerikanischen Raum beschrieben wurde. Bei diesen Rindern konnte eine Punktmutation (c.T911C), die zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch (p.L234P) führt, als Ursache für die Thrombozytopathie identifiziert werden. Obwohl diese Mutation auch bei den 44 FV-Tieren mit auffälliger Thrombozytenaggregationsmessung homozygot vorliegt, bleibt unklar ob die p.L234P-Variante tatsächlich kausal für diese Störung der Blutgerinnung ist. Daher sollten zusätzliche Fälle untersucht und Studien zum Einfluss der p.L234P-Variante auf die Proteinfunktion durchgeführt werden.

Die hohe Frequenz des prädisponierenden Haplotypen (6,9 %) und die Identifizierung von elf homozygoten genomischen Jungvererbern mit hohen genomischen Zuchtwerten machen deutlich, dass die Blutgerinnungsstörung in Zukunft eine große Rolle in der Fleckvieh-Zucht spielen wird.

Da Array-basierte Genotypen mittlerweile routinemäßig im Rahmen der genomischen Zuchtwertschätzung erhoben werden, können Träger der prädisponierenden Haplotypen schnell und kostengünstig identifiziert werden. Diese Tiere sollten für die Untersuchung des BHZD-ähnlichen Syndroms an der kausalen p.W215X-Mutation genotypisiert und bestätigte Träger des Defektallels von der künstlichen Besamung ausgeschlossen werden. FV-Bullen, die den prädisponierenden Haplotypen der Thrombozytopathie tragen sollten ebenfalls im Rahmen der routinemäßigen Genotypisierung identifiziert und gekennzeichnet werden.

Dieser kosteneffektive Ansatz wird unnötiges Tierleiden und wirtschaftliche Verluste durch die Vermeidung von Verpaarungen verifizierter Träger des Defektallels bzw. Träger des krankheitsassoziierten Haplotyps verhindern.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der molekulargenetischen Architektur von zwei kürzlich entdeckten Erbkrankheiten in der Deutschen Fleckvieh-Population.

Seit 2009 wurden vermehrt Fleckvieh-Kälber mit einem sehr schlechten Allgemeinzustand und Hautveränderungen auffällig. Das Krankheitsbild der betroffenen FV-Kälber ähnelt der Symptomatik der bovinen hereditären Zinkdefizienz (BHZD) bei Rindern der Rasse Holstein-Friesian. Durch eine erste molekulargenetische Untersuchung der betroffenen Kälber wurden Polymorphismen in dem postulierten Gen (*SLC39A4*) als ursächlich für das BHZD-ähnliche Syndrom beim Deutschen Fleckvieh ausgeschlossen. Eine weiterführende genomweite Assoziationsstudie konnte eine signifikante Assoziation ($P = 5,87 \times 10^{-89}$) des Krankheitsbildes mit dem distalen Ende auf BTA21 nachweisen. Die Autozygotiekartierung der krankheitsassoziierten Region konnte ein 1023 kb langes homozygotes Segment (70.550.045 bp – 71.573.501 bp) identifizieren. In dieser assoziierten Region sind zwei Zinktransporter (*CRIP1* und *CRIP2*) mit funktionaler Ähnlichkeit zu *SLC39A4* lokalisiert. Bei der molekulargenetischen Untersuchung der beiden Gene wurden keine Varianten entdeckt, die das BHZD-ähnliche Syndrom verursachen könnten. Die Identifizierung der verursachenden Mutation erfolgte durch die genomweite Re-Sequenzierung eines erkrankten FV-Kalbes in dem Phospholipase D4-kodierenden Gen *PLD4*. Der kausale Basenaustausch führt zum Einbau eines Stoppcodons und damit zu einer verfrühten Translations-termination. Es ist zu vermuten, dass das entstehende Protein durch den Verlust mindestens einer funktionalen Domäne eine stark eingeschränkte bis fehlende Funktionalität aufweist. Eine Überprüfung des Vorkommens dieser Variante in 2322 Rindern konnte zeigen, dass nur die erkrankten FV-Kälber die Variante homozygot tragen.

Im Rahmen der bovinen neonatalen Panzytopenie (BNP)-Untersuchungen wurden vermehrt FV-Rinder mit starker Blutungsneigung auffällig, deren Blutbilder nicht dem klinischen BNP-Bild entsprachen. Betroffene Tiere hatten in der Regel ein ungestörtes Allgemeinbefinden, litten aber nach Verletzungen der Haut an längerfristigen Blutungsepisoden sowie Blutungen der Nase und Schleimhäute. Eine Messung der Thrombozytenaggregation konnte bei den betroffenen Tieren eine Störung der Blutgerinnung nachweisen. Bisher wurde eine erbliche Störung der Blutplättchenaggregation vermehrt nur bei Simmental-Rindern im nordamerikanischen Raum beobachtet.

Als Ursache dieser Thrombozytopathie wird eine Punktmutation im Exon 7 des *RasGRP2* angegeben, die zu einem Aminosäureaustausch (c.T911C, p.L234P) und damit wahrscheinlich zu einer gestörten Funktionalität des Proteins führt. Die molekulargenetische Untersuchung des Gens in 101 Fleckvieh-Tieren konnte den c.T911C-Polymorphismus in der Deutschen Fleckvieh-Population validieren. Alle 44 Tiere mit einer bestätigten Thrombozytenfunktionsstörung tragen das Defektallel homozygot. Zusätzlich tragen zehn Tiere ohne oder mit uneindeutiger Thrombozytenaggregationsmessung diesen Polymorphismus homozygot. Eine genomweite Assoziationsstudie konnte eine signifikante Assoziation ($P = 4,88 \times 10^{-96}$) des Phänotyps mit BTA29 nachweisen. Die Autozygotiekartierung der krankheitsassoziierten Region konnte ein 2098 kb langes homozygotes Segment (41.968.900 bp – 44.067.207 bp) für die 32 genotypisierten FV-Tiere identifizieren. Innerhalb dieses Bereichs ist auch das postulierte *RasGRP2*-Gen lokalisiert. Acht Tiere ohne oder mit uneindeutiger Thrombozytenaggregationsmessung tragen die krankheitsassoziierte Region ebenfalls homozygot. Berücksichtigt man diese Tiere bei der Autozygotiekartierung verkürzt sich der homozygote Bereich auf 1407 kb (41.968.900 bp – 43.375.960 bp). *RasGRP2* liegt nicht mehr innerhalb dieser Region. Es ist daher möglich, dass die krankheitsverursachende Mutation nicht die postulierte p.L234P-Variante ist. Innerhalb der assoziierten Region befinden sich Gene, die an der Blutgerinnung sowie der Struktur des vaskulären Systems beteiligt sind. Bisher konnten in keinem dieser Gene Mutationen entdeckt werden, die den Phänotyp der Erkrankung erklären würden. Daher sind weitere Untersuchungen zur Identifizierung der kausalen Variante notwendig.

Die vorliegende Dissertation konnte zeigen, dass die Entschlüsselung der genetischen Architektur erblicher Erkrankungen oftmals mit Schwierigkeiten verbunden ist. Jedoch ermöglicht die Kombination verschiedener molekulargenetischer Methoden (genomweite Assoziationsstudie, Autozygotiekartierung und genomweite Re-Sequenzierung einzelner Tiere) das Auffinden ursächlicher Varianten. Erbliche Defekte sollten so in der Zukunft schnell kartiert und entschlüsselt werden können, so dass unnötiges Tierleiden und wirtschaftliche Verluste vermieden werden können.

6 Summary

The aim of this study was the molecular genetic dissection of two recently identified congenital diseases of the Fleckvieh population.

Since 2009 calves with severe skin lesions and a poor general health status have been identified in the Fleckvieh population. Clinical findings of the affected calves were similar to the phenotypic appearance of Holstein-Friesian calves suffering from the bovine hereditary zinc deficiency (BHZD). The molecular genetic analysis precluded variants in *SCL39A4*, the postulated gene responsible for BHZD, to be causal for the BHZD-like syndrome in Fleckvieh cattle. A genome-wide association study revealed a strong association signal ($P = 5,87 \times 10^{-89}$) on BTA21. Autozygosity mapping detected a common 1023 kb (70.550.045 bp – 71.573.501 bp) segment of extended homozygosity in the eight affected calves. Two zinc transport coding genes (*CRIP1* and *CRIP2*) with functional similarity to *SLC39A4* are located within this region. However, polymorphisms in these genes were excluded to be associated with the BHZD-like syndrome. The genome-wide re-sequencing of one affected calf revealed a putative loss-of-function mutation in the phospholipase D family member 4 (*PLD4*) encoding gene, resulting in an impaired function of the protein. The p.W215X mutation was perfectly associated in a panel of 2322 animals, only the affected calves carry this variant homozygous.

In the context of the bovine neonatal pancytopenia-examination animals with severe bleeding episodes but a normal blood count have been identified in the Fleckvieh population. Affected animals have a normal general condition but suffer of prolonged skin haemorrhage as well as epistaxis and gingival bleeding. The measurement of the platelet aggregation proved a functional disorder of the animal's thrombocyte aggregation. So far, an inherited disorder of platelet aggregation has only been reported for Simmental cattle in Northern America. This disorder is caused by a mutation in *RasGRP2*, resulting in a non-synonymous change of aminoacids (p.L234P) and therefore presumably in an impaired function of the encoded protein. The molecular genetic analysis of this variant in 101 Fleckvieh animals validated the c.T911C polymorphism in the FV-population. All 44 animals with a proven impaired function of platelet aggregation carried the defect allele homozygous. In addition, ten animals with no or an ambiguous measurement of the thrombocyte aggregation carried this mutation homozygous. A genome-wide association study

detected a strong association signal ($P = 4,88 \times 10^{-96}$) on BTA29. Autozygosity mapping revealed a common 2098 kb (41.968.900 bp – 44.067.207 bp) segment of extended homozygosity in the 32 affected animals. The postulated *RasGRP2* gene is located within this region. However, eight animals with no or an ambiguous measurement of the thrombocyte aggregation carried the associated region homozygous as well. Taken these animals into account for the autozygosity mapping, the common segment of extended homozygosity shortens to 1407 kb (41.968.900 bp – 43.375.960 bp). *RasGRP2* is not located within this region anymore. Therefore it seems possible that the postulated *RasGRP2*-polymorphism is not aetiological for the thrombocytopathia in Fleckvieh cattle. Genes, that are involved in blood coagulation, are located within the identified common segment of extended homozygosity. However, none of the detected polymorphisms within these genes was associated with the disease phenotype. Therefore further molecular genetic analyses have to be performed in order to unravel the genetic architecture of this disorder.

This thesis demonstrated that the unraveling of the genetic architecture of inherited disorders can be difficult. However, the combination of different molecular genetic methods (genome-wide association study, autozygosity mapping and genome-wide re-sequencing) allows for the identification of causal variants. Therefore the quick mapping and disentangling of congenital disorders should be possible to avoid unneeded animal suffering and economical losses.

7 Danksagung

Als ersten möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ruedi Fries für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation, die hilfreiche Unterstützung, die vielen Ratschläge und die Möglichkeit in so einem herausragenden Labor zu arbeiten, bedanken.

Für die Finanzierung möchte ich mich bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), dem Förderverein Biotechnologieforschung e.V. (FBF) und der Universität Bayern e.V. bedanken.

Weiterhin danke ich Dr. med. vet. Nicole Gollnick, Dr. med. vet. Martin Langenmayer, Dr. med. vet. Annette Pfitzner und Lisa Lüchtenborg von der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität München für die hervorragende Zusammenarbeit. Ohne euer waches Auge wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Des Weiteren geht mein großer Dank für die administrative Unterstützung an Birgit Hoffmann.

Ganz besonders möchte ich mich beim Laborpersonal des Lehrstuhls für Tierzucht für die Hilfe in den vergangenen Jahren bedanken. Auch möchte ich Dr. Krzysztof Flisikowski danken, der mich viel gelehrt hat und mir in den vergangenen Jahren immer hilfreich zur Seite gestanden hat.

Weiterhin geht mein herzlicher Dank an meine Kollegen Andrea, Bernhard, Christoph, Kai, Hubert, Sandra, Tini und Xiaolong, die es mit ihrer herzlichen und fröhlichen Art geschafft haben, dass sich mein Büro wie ein zweites Zuhause anfühlt. Insbesondere möchte ich mich bei Hubert, Sandra und Tini für die vielen fruchtbaren und sehr lustigen Mittagspausen und freitagnachmittags Diskussionen bedanken. Mein spezieller Dank geht an meine langjährige Bürokollegin Tini. Wir haben uns vom ersten Tag an ohne Worte verstanden, es war mir immer eine Freude mit dir das Büro teilen zu dürfen.

Darüber hinaus möchte ich mich aus tiefem Herzen bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wäre. Ihr habt mich immer bedenkenlos bei all meinen Entscheidungen unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden,

bessere Eltern kann man sich nicht wünschen. Ich möchte mich auch bei meinen Schwestern mit Anhängen bedanken, mit euch an meiner Seite macht alles immer sehr viel mehr Spaß. Weiterhin möchte ich mich auch bei meinen Schwiegereltern für die liebevolle Unterstützung bedanken.

Als letztes geht mein Dank an meinen Mann, meiner besseren Hälfte und treuem Weggefährten. Du hast mich in jeder Phase begleitet, stets gestärkt und nie an mir gezweifelt. Ich danke dir für die unzähligen Lacher und frohen Stunden mit denen du mir das Leben so viel schöner machst und ich hoffe, dass wir noch so einige schöne Jahrzehnte miteinander verbringen können.

Simone

8 Literatur

- ABBASI A. R., IHARA N., WATANABE T., KHALAJ M., TSUJI T., SUGIMOTO Y., KUNIEDA T., 2005 Linkage mapping of the locus responsible for congenital multiple ocular defects in cattle on bovine Chromosome 18. *Mamm. Genome* **16**: 731–737.
- ADZHUBEI I. A., SCHMIDT S., PESHKIN L., RAMENSKY V. E., GERASIMOVA A., BORK P., KONDRASHOV A. S., SUNYAEV S. R., 2010 A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**: 248–249.
- AGERHOLM J. S., 2007 Inherited Disorders in Danish Cattle. *APMIS* **115**: 1–76.
- AGERHOLM J. S., BENDIXEN C., ARNBJERG J., ANDERSEN O., 2004 Morphological variation of “complex vertebral malformation” in Holstein calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* **16**: 548–553.
- ALTSCHUL S. F., GISH W., MILLER W., MYERS E. W., LIPMAN D. J., 1990 Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410.
- ANDREWS G. K., 2008 Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem. Soc. Trans.* **36**: 1242–1246.
- ANTALA S., DEMPSKI R. E., 2012 The human ZIP4 transporter has two distinct binding affinities and mediates transport of multiple transition metals. *Biochemistry* **51**: 963–973.
- ARUN S. N., XIE D., HOWARD A. C., ZHONG Q., ZHONG X., McNEIL P. L., BOLLAG W. B., 2013 Cell wounding activates phospholipase D in primary mouse keratinocytes. *J. Lipid Res.* **54**: 581–591.
- AVERDUNK G., GOTTSCHALK A., PUTZ M., ROSENBERGER E., 2001 *Fleckvieh: Entwicklung zu einer Weltrasse*. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München.
- AWANO T., JOHNSON G. S., WADE C. M., KATZ M. L., JOHNSON G. C., TAYLOR J. F., PERLOSKI M., BIAGI T., BARANOWSKA I., LONG S., MARCH P. A., OLBY N. J., SHELTON G. D., KHAN S., O'BRIEN D. P., LINDBLAD-TOH K., COATES J. R., 2009 Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 2794–2799.
- BALL P. J. H., PETERS A. R., 2008 *Reproduction in Cattle*. John Wiley & Sons.
- BANNO Y., NAKASHIMA S., HACHIYA T., NOZAWA Y., 1995 Endogenous cleavage of phospholipase C-beta 3 by agonist-induced activation of calpain in human platelets. *J. Biol. Chem.* **270**: 4318–4324.
- BERGMEIER W., GOERGE T., WANG H.-W., CRITTENDEN J. R., BALDWIN A. C. W., CIFUNI S. M., HOUSMAN D. E., GRAYBIEL A. M., WAGNER D. D., 2007 Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. *J. Clin. Invest.* **117**: 1699–1707.

- BÖTTCHER R. T., LANGE A., FÄSSLER R., 2009 How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**: 670–675.
- BOUAOUINA M., CALDERWOOD D. A., 2011 Kindlins. *Current Biology* **21**: R99–R101.
- BOUDREAUX M. K., CATALFAMO J. L., KLOK M., 2007a Calcium-diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I gene mutations associated with loss of function in canine platelets. *Transl Res* **150**: 81–92.
- BOUDREAUX M. K., SCHMUTZ S. M., FRENCH P. S., 2007b Calcium diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I (CalDAG-GEFI) gene mutations in a thrombopathic Simmental calf. *Vet. Pathol.* **44**: 932–935.
- BRADE W., FLACHOWSKY G., 2007 Rinderzucht und Rindfleischerzeugung - Empfehlungen für die Praxis. *Landbauforschung Völkenrode*: 44–51.
- BRAS J., GUERREIRO R., HARDY J., 2012 Use of next-generation sequencing and other whole-genome strategies to dissect neurological disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**: 453–464.
- BROOS K., FEYS H. B., MEYER S. F. DE, VANHOORELBEKE K., DECKMYN H., 2011 Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* **25**: 155–167.
- BROOS K., MEYER S. F. DE, FEYS H. B., VANHOORELBEKE K., DECKMYN H., 2012 Blood platelet biochemistry. *Thromb. Res.* **129**: 245–249.
- BROWN H. A., HENAGE L. G., PREININGER A. M., XIANG Y., EXTON J. H., 2007 Biochemical Analysis of Phospholipase D. In: *Lipidomics and Bioactive Lipids: Lipids and Cell Signaling*, Academic Press, pp. 49–87.
- BROWNING B. L., BROWNING S. R., 2009 A unified approach to genotype imputation and haplotype-phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *Am. J. Hum. Genet.* **84**: 210–223.
- BRUMMERSTEDT E., 1977 Animal model of human disease. Acrodermatitis enteropathica, zinc malabsorption. *Am. J. Pathol.* **87**: 725–728.
- BRUSIUS-FACCHIN A. C., SOUZA C. F. M. DE, SCHWARTZ I. V. D., RIEGEL M., MELARAGNO M. I., CORREIA P., MORAES L. M., LLERENA J. Jr, GIUGLIANI R., LEISTNER-SEGAL S., 2012 Severe phenotype in MPS II patients associated with a large deletion including contiguous genes. *Am. J. Med. Genet. A* **158A**: 1055–1059.
- BUITKAMP J., EWALD D., MASABANDA J., BISHOP M. D., FRIES R., 2003 FISH and RH mapping of the bovine alpha (2)/delta calcium channel subunit gene (CACNA2D1). *Anim. Genet.* **34**: 309–310.
- BUITKAMP J., SEMMER J., GOTZ K.-U., 2011 Arachnomelia syndrome in Simmental cattle is caused by a homozygous 2-bp deletion in the molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (MOCS1). *BMC Genetics* **12**: 11.

- BURSET M., SELEDTSOV I. A., SOLOVYEV V. V., 2000 Analysis of Canonical and Non-Canonical Splice Sites in Mammalian Genomes. *Nucl. Acids Res.* **28**: 4364–4375.
- BUSSONE G., MOUTHON L., 2011 Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* **10**: 248–255.
- CALLAN M. B., WALTON R., JEZYK P. F., GIGER U., 2001 Thrombopathies causing bleeding in a boxer and mixed-breed dog. *J Am Anim Hosp Assoc* **37**: 244–250.
- CARNINCI P., SANDELIN A., LENHARD B., KATAYAMA S., SHIMOKAWA K., PONJAVIC J., SEMPLE C. A. M., TAYLOR M. S., ENGSTRÖM P. G., FRITH M. C., FORREST A. R. R., ALKEMA W. B., TAN S. L., PLESSY C., KODZIUS R., RAVASI T., KASUKAWA T., FUKUDA S., KANAMORI-KATAYAMA M., KITAZUME Y., KAWAJI H., KAI C., NAKAMURA M., KONNO H., NAKANO K., MOTTAGUI-TABAR S., ARNER P., CHESI A., GUSTINCICH S., PERSICETTI F., SUZUKI H., GRIMMOND S. M., WELLS C. A., ORLANDO V., WAHLESTEDT C., LIU E. T., HARBERS M., KAWAI J., BAJIC V. B., HUME D. A., HAYASHIZAKI Y., 2006 Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat. Genet.* **38**: 626–635.
- CASANOVA L., FREI-TSCHOPP C., GRÜTER O., MOLL J., 2003 Erbfehler und Erbhygiene am Beispiel des Braunviehs aus Erbfehler und Erbhygiene: Seminar des genetischen Ausschusses der ZAR.
- CAVANAGH J. A. L., TAMMEN I., WINDSOR P. A., BATEMAN J. F., SAVARIRAYAN R., NICHOLAS F. W., RAADSMA H. W., 2007 Bulldog dwarfism in Dexter cattle is caused by mutations in ACAN. *Mamm. Genome* **18**: 808–814.
- CHARLIER C., AGERHOLM J. S., COPPIETERS W., KARLSKOV-MORTENSEN P., LI W., JONG G. DE, FASQUELLE C., KARIM L., CIRERA S., CAMBISANO N., AHARIZ N., MULLAART E., GEORGES M., FREDHOLM M., 2012 A Deletion in the Bovine FANCI Gene Compromises Fertility by Causing Fetal Death and Brachyspina. *PLoS ONE* **7**: e43085.
- CHARLIER C., COPPIETERS W., ROLLIN F., DESMECHT D., AGERHOLM J. S., CAMBISANO N., CARTA E., DARDANO S., DIVE M., FASQUELLE C., FRENNET J.-C., HANSET R., HUBIN X., JORGENSEN C., KARIM L., KENT M., HARVEY K., PEARCE B. R., SIMON P., TAMA N., NIE H., VANDEPUTTE S., LIEN S., LONGERI M., FREDHOLM M., HARVEY R. J., GEORGES M., 2008 Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nat Genet* **40**: 449–454.
- CHAVALI S., GHOSH S., BHARADWAJ D., 2009 Hemophilia B is a quasi-quantitative condition with certain mutations showing phenotypic plasticity. *Genomics* **94**: 433–437.
- CHEUNG A. K. L., KO J. M. Y., LUNG H. L., CHAN K. W., STANBRIDGE E. J., ZABAROVSKY E., TOKINO T., KASHIMA L., SUZUKI T., KWONG D. L.-W., CHUA D., TSAO S. W., LUNG M. L., 2011 Cysteine-rich intestinal protein 2 (CRIP2) acts as a repressor of NF-kappaB-mediated proangiogenic cytokine transcription to suppress tumorigenesis and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 8390–8395.
- CHIZZOLINI C., BREMBILLA N. C., MONTANARI E., TRUCHETET M.-E., 2011 Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* **10**: 276–281.

- CIFUNI S. M., WAGNER D. D., BERGMEIER W., 2008 CalDAG-GEFI and protein kinase C represent alternative pathways leading to activation of integrin alphaIIb beta3 in platelets. *Blood* **112**: 1696–1703.
- CLEMPSON A. M., POLLOTT G. E., BRICKELL J. S., BOURNE N. E., MUNCE N., WATHES D. C., 2011 Polymorphisms in the autosomal genes for mitochondrial function TFAM and UCP2 are associated with performance and longevity in dairy cows. *Animal* **5**: 1335–1343.
- COUSINS R. J., 2010 Gastrointestinal factors influencing zinc absorption and homeostasis. *Int J Vitam Nutr Res* **80**: 243–248.
- COUSINS R. J., LANNINGHAM-FOSTER L., 2000 Regulation of cysteine-rich intestinal protein, a zinc finger protein, by mediators of the immune response. *J. Infect. Dis.* **182 Suppl 1**: S81–84.
- DAMÉ M. C. F., XAVIER G. M., OLIVEIRA-FILHO J. P., BORGES A. S., OLIVEIRA H. N., RIET-CORREA F., SCHILD A. L., 2012 A nonsense mutation in the tyrosinase gene causes albinism in water buffalo. *BMC Genet.* **13**: 62.
- DRÖGEMÜLLER C., REICHART U., SEUBERLICH T., OEVERMANN A., BAUMGARTNER M., KÜHNI BOGHENBOR K., STOFFEL M. H., SYRING C., MEYLAN M., MÜLLER S., MÜLLER M., GREDLER B., SÖLKNER J., LEEB T., 2011 An unusual splice defect in the mitofusin 2 gene (MFN2) is associated with degenerative axonopathy in Tyrolean Grey cattle. *PLoS ONE* **6**: e18931.
- DRÖGEMÜLLER C., TETENS J., SIGURDSSON S., GENTILE A., TESTONI S., LINDBLAD-TOH K., LEEB T., 2010 Identification of the Bovine Arachnomelia Mutation by Massively Parallel Sequencing Implicates Sulfite Oxidase (SUOX) in Bone Development. *PLoS Genet* **6**: e1001079.
- DU W., JIANG P., LI N., MEI Y., WANG X., WEN L., YANG X., WU M., 2009 Suppression of p53 activity by Siva1. *Cell Death Differ.* **16**: 1493–1504.
- DUFNER-BEATTIE J., WANG F., KUO Y.-M., GITSCHIER J., EIDE D., ANDREWS G. K., 2003 The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. *J. Biol. Chem.* **278**: 33474–33481.
- DUFNER-BEATTIE J., WEAVER B. P., GEISER J., BILGEN M., LARSON M., XU W., ANDREWS G. K., 2007 The mouse acrodermatitis enteropathica gene Slc39a4 (Zip4) is essential for early development and heterozygosity causes hypersensitivity to zinc deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **16**: 1391–1399.
- DUNNER S., CHARLIER C., FARNIR F., BROUWERS B., CANON J., GEORGES M., 1997 Towards interbreed IBD fine mapping of the mh locus: double-muscling in the Asturiana de los Valles breed involves the same locus as in the Belgian Blue cattle breed. *Mamm. Genome* **8**: 430–435.
- ECK S. H., BENET-PAGÈS A., FLISIKOWSKI K., MEITINGER T., FRIES R., STROM T. M., 2009 Whole genome sequencing of a single *Bos taurus* animal for single nucleotide polymorphism discovery. *Genome Biol.* **10**: R82.
- EGGER-DANNER C., WILLIAM A., 2003 Berücksichtigung von Erbfehlern in Zuchtprogrammen aus Erbfehler und Erbhygiene: Seminar des genetischen Ausschusses der ZAR. : 28–35.

- EIDE D. J., 2004 The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch.* **447**: 796–800.
- ETZIONI A., 2010 Defects in the leukocyte adhesion cascade. *Clin Rev Allergy Immunol* **38**: 54–60.
- EWING B., GREEN P., 1998 Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**: 186–194.
- EWING B., HILLIER L., WENDL M. C., GREEN P., 1998 Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**: 175–185.
- FARNDALE R. W., SILJANDER P. R., ONLEY D. J., SUNDARESAN P., KNIGHT C. G., BARNES M. J., 2003 Collagen-platelet interactions: recognition and signalling. *Biochem. Soc. Symp.*: 81–94.
- FENOUIL R., CAUCHY P., KOCH F., DESCOSTES N., CABEZA J. Z., INNOCENTI C., FERRIER P., SPICUGLIA S., GUT M., GUT I., ANDRAU J.-C., 2012 CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters. *Genome Res.* **22**: 2399–2408.
- FLOREA L., SOUVOROV A., KALBFLEISCH T. S., SALZBERG S. L., 2011 Genome Assembly Has a Major Impact on Gene Content: A Comparison of Annotation in Two *Bos Taurus* Assemblies. *PLoS One* **6**.
- FOX-CLIPSHAM L. Y., CARTER S. D., GOODHEAD I., HALL N., KNOTTENBELT D. C., MAY P. D. F., OLLIER W. E., SWINBURNE J. E., 2011 Identification of a Mutation Associated with Fatal Foal Immunodeficiency Syndrome in the Fell and Dales Pony. *PLoS Genet* **7**: e1002133.
- FRISCHMEYER P. A., DIETZ H. C., 1999 Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 1893–1900.
- FROJMOVIC M. M., WONG T., SEARCY G. P., 1996 Platelets from bleeding Simmental cattle have a long delay in both ADP-activated expression of GpIIB-IIIa receptors and fibrinogen-dependent platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* **76**: 1047–1052.
- GARDINER-GARDEN M., FROMMER M., 1987 CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196**: 261–282.
- GENTILE A., TESTONI S., 2006 Inherited disorders of cattle: a selected review. *Slov Vet Res* **43**: 17–29.
- GENTRY P. A., CHERYK L. A., SHANKS R. D., HEALEY R., 1997 An inherited platelet function defect in a Simmental crossbred herd. *Can. J. Vet. Res.* **61**: 128–133.
- GEORGES M., DIETZ A. B., MISHRA A., NIELSEN D., SARGEANT L. S., SORENSEN A., STEELE M. R., ZHAO X., LEIPOLD H., WOMACK J. E., 1993 Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 1058–1062.

- GIBBS R. A., TAYLOR J. F., TASSELL C. P. VAN, BARENDSE W., EVERSOLE K. A., *et al.*, 2009 Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science* **324**: 528–532.
- GORDON D., ABAJIAN C., GREEN P., 1998 Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* **8**: 195–202.
- GRALL A., GUAGUÈRE E., PLANCHAIS S., GROND S., BOURRAT E., HAUSSE I., HITTE C., GALLO M. LE, DERBOIS C., KIM G.-J., LAGOUTTE L., DEGORCE-RUBIALES F., RADNER F. P. W., THOMAS A., KÜRY S., BENSIGNOR E., FONTAINE J., PIN D., ZIMMERMANN R., ZECHNER R., LATHROP M., GALIBERT F., ANDRÉ C., FISCHER J., 2012 PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat. Genet.* **44**: 140–147.
- GREMME G., BRENDEN V., SPARKS M. E., KURTZ S., 2005 Engineering a software tool for gene structure prediction in higher organisms. *Information and Software Technology* **47**: 965–978.
- GUERINOT M. L., 2000 The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**: 190–198.
- GULSUNER S., TEKINAY A. B., DOERSCHNER K., BOYACI H., BILGUVAR K., UNAL H., ORS A., ONAT O. E., ATALAR E., BASAK A. N., TOPALOGLU H., KANSU T., TAN M., TAN U., GUNEL M., OZCELIK T., 2011 Homozygosity mapping and targeted genomic sequencing reveal the gene responsible for cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in a consanguineous kindred. *Genome Res.* **21**: 1995–2003.
- HAGBERG C. E., FALKEVALL A., WANG X., LARSSON E., HUUSKO J., NILSSON I., MEETEREN L. A. van, SAMEN E., LU L., VANWILDEMEERSCH M., KLAR J., GENOVE G., PIETRAS K., STONE-ELANDER S., CLAESSEON-WELSH L., YL[AUML]-HERTTUALA S., LINDAHL P., ERIKSSON U., 2010 Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* **464**: 917–921.
- HALLQUIST N. A., KHOO C., COUSINS R. J., 1996 Lipopolysaccharide regulates cysteine-rich intestinal protein, a zinc-finger protein, in immune cells and plasma. *J. Leukoc. Biol.* **59**: 172–177.
- HAMBLIN M. J., HORTON M. R., 2011 Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: diagnostic dilemma. *Pulm Med* **2011**: 872120.
- HANKE A. A., ROBERG K., MONACA E., SELLMANN T., WEBER C. F., RAHE-MEYER N., GÖRLINGER K., 2010 Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). *Eur. J. Med. Res.* **15**: 214–219.
- HARRIS B., WARD-BAILEY P. F., BERGSTROM D. E., BRONSON R. T., DONAHUE L. R., 2011 Thin hair with small size (thss) is a new recessive hair mutation on Chromosom 12. MGI Direct Data Submission to Mouse Genome Database (MGD).
- HAYASHI R., GOTO Y., IKEDA R., YOKOYAMA K. K., YOSHIDA K., 2006 CDCA4 is an E2F transcription factor family-induced nuclear factor that regulates E2F-dependent transcriptional activation and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **281**: 35633–35648.

- HAYES B. J., PRYCE J., CHAMBERLAIN A. J., BOWMAN P. J., GODDARD M. E., 2010 Genetic architecture of complex traits and accuracy of genomic prediction: coat colour, milk-fat percentage, and type in Holstein cattle as contrasting model traits. *PLoS Genet.* **6**: e1001139.
- HEALY P. J., 1996 Testing for undesirable traits in cattle: an Australian perspective. *J. Anim. Sci.* **74**: 917–922.
- HEMPE J. M., COUSINS R. J., 1991 Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 9671–9674.
- HICKSON N., HAMPSHIRE D., WINSHIP P., GOUEMAND J., SCHNEPPENHEIM R., BUDDE U., CASTAMAN G., RODEGHIRO F., FEDERICI A. B., JAMES P., PEAKE I., EIKENBOOM J., GOODEVE A., 2010 von Willebrand factor variant p.Arg924Gln marks an allele associated with reduced von Willebrand factor and factor VIII levels. *J. Thromb. Haemost.* **8**: 1986–1993.
- HIRANO T., MATSUHASHI T., KOBAYASHI N., WATANABE T., SUGIMOTO Y., 2012 Identification of an FBN1 mutation in bovine Marfan syndrome-like disease. *Anim. Genet.* **43**: 11–17.
- HOESCHELE I., MEINERT T. R., 1990 Association of genetic defects with yield and type traits: the weaver locus effect on yield. *J. Dairy Sci.* **73**: 2503–2515.
- IHARA N., FUJITA T., SHIGA K., ITOH M., WATANABE T., SUGIMOTO Y., 2005 Linkage analysis reveals two independent loci for ocular disorders in a local Japanese Black cattle population. *Anim. Genet.* **36**: 132–134.
- JANSEN S., AIGNER B., PAUSCH H., WYSOCKI M., ECK S., BENET-PAGÈS A., GRAF E., WIELAND T., STROM T. M., MEITINGER T., FRIES R., 2013 Assessment of the genomic variation in a cattle population by re-sequencing of key animals at low to medium coverage. *BMC Genomics* **14**: 446.
- JEZYK P. F., HASKINS M. E., MACKAY-SMITH W. E., PATTERSON D. F., 1986 Lethal acrodermatitis in bull terriers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **188**: 833–839.
- JOHNSON J. L., LEIPOLD H. W., SNIDER G. W., BAKER R. D., 1980 Progeny testing for bovine syndactyly. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **176**: 549–550.
- JOHNSTONE I. B., LOTZ F., 1979 An inherited platelet function defect in Basset hounds. *Can. Vet. J.* **20**: 211–215.
- JOSS S. K., GHAZAWY S., TOMKINS S., AHMED M., BRADBURY J., SHERIDAN E., 2008 Variable expression of neurological phenotype in autosomal recessive oculodentodigital dysplasia of two sibs and review of the literature. *Eur. J. Pediatr.* **167**: 341–345.
- JURK K., KEHREL B. E., 2005a Platelets: physiology and biochemistry. *Semin. Thromb. Hemost.* **31**: 381–392.
- JURK K., KEHREL B. E., 2005b [Platelets and the new comprehension of haemostasis]. *Hamostaseologie* **25**: 39–49.

- JURK K., SCHULZ A. S., KEHREL B. E., RÄPPEL D., SCHULZE H., MÖBEST D., FRIEDRICH W. W., OMRAN H., DEAK E., HENSCHLER R., SCHEELE J. S., ZIEGER B., 2010 Novel integrin-dependent platelet malfunction in siblings with leukocyte adhesion deficiency-III (LAD-III) caused by a point mutation in FERMT3. *Thromb. Haemost.* **103**: 1053–1064.
- KALAY E., SEZGIN O., CHELLAPPA V., MUTLU M., MORSY H., KAYSERILI H., KREIGER E., CANSU A., TORAMAN B., ABDALLA E. M., ASLAN Y., PILLAI S., AKARSU N. A., 2012 Mutations in RIPK4 Cause the Autosomal-Recessive Form of Popliteal Pterygium Syndrome. *Am J Hum Genet* **90**: 76–85.
- KARIM M. A., OHTA K., EGASHIRA M., JINNO Y., NIKAWA N., MATSUDA I., INDO Y., 1996 Human ESP1/CRP2, a member of the LIM domain protein family: characterization of the cDNA and assignment of the gene locus to chromosome 14q32.3. *Genomics* **31**: 167–176.
- KAROUI S., CARABAÑO M. J., DÍAZ C., LEGARRA A., 2012 Joint genomic evaluation of French dairy cattle breeds using multiple-trait models. *Genet. Sel. Evol.* **44**: 39.
- KEHREL B. E., 2008 [Platelets: biochemistry and physiology]. *Hamostaseologie* **28**: 289–298.
- KHATKAR M. S., NICHOLAS F. W., COLLINS A. R., ZENGER K. R., CAVANAGH J. A. L., BARRIS W., SCHNABEL R. D., TAYLOR J. F., RAADSMA H. W., 2008 Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC Genomics* **9**: 187.
- KILIC S. S., ETZIONI A., 2009 The clinical spectrum of leukocyte adhesion deficiency (LAD) III due to defective CalDAG-GEF1. *J. Clin. Immunol.* **29**: 117–122.
- KILLIAN R. L., FLIPPIN J. D., HERRERA C. M., ALMENAR-QUERALT A., GOLDSTEIN L. S. B., 2012 Kinesin light chain 1 suppression impairs human embryonic stem cell neural differentiation and amyloid precursor protein metabolism. *PLoS ONE* **7**: e29755.
- KIRCHMAIER C. M., PILLITTERI D., 2010 [Congenital thrombocytopathies]. *Internist (Berl)* **51**: 1109–1114, 1116–1117.
- KOCH S., CLAESON-WELSH L., 2012 Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006502.
- KOLBEHDARI D., WANG Z., GRANT J. R., MURDOCH B., PRASAD A., XIU Z., MARQUES E., STOTHARD P., MOORE S. S., 2009 A whole genome scan to map QTL for milk production traits and somatic cell score in Canadian Holstein bulls. *J. Anim. Breed. Genet.* **126**: 216–227.
- KRAMETTER-FROETSCHER R., HAUSER S., BAUMGARTNER W., 2005 Zinc-responsive dermatosis in goats suggestive of hereditary malabsorption: two field cases. *Vet. Dermatol.* **16**: 269–275.
- KUIJPERS T. W., VIJVER E. VAN DE, WETERMAN M. A. J., BOER M. DE, TOOL A. T. J., BERG T. K. VAN DEN, MOSER M., JAKOBS M. E., SEEGER K., SANAL O., UNAL S., CETIN M., ROOS D., VERHOEVEN A. J., BAAS F., 2009 LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3. *Blood* **113**: 4740–4746.

- KÜRY S., DRÉNO B., BÉZIEAU S., GIRAUDET S., KHARFI M., KAMOUN R., MOISAN J.-P., 2002 Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat. Genet.* **31**: 239–240.
- KÜRY S., KHARFI M., KAMOUN R., TAÏEB A., MALLET E., BAUDON J.-J., GLASTRE C., MICHEL B., SEBAG F., BROOKS D., SCHUSTER V., SCOUL C., DRÉNO B., BÉZIEAU S., MOISAN J.-P., 2003 Mutation spectrum of human SLC39A4 in a panel of patients with acrodermatitis enteropathica. *Hum. Mutat.* **22**: 337–338.
- LANNINGHAM-FOSTER L., GREEN C. L., LANGKAMP-HENKEN B., DAVIS B. A., NGUYEN K. T., BENDER B. S., COUSINS R. J., 2002 Overexpression of CRIP in transgenic mice alters cytokine patterns and the immune response. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **282**: E1197–E1203.
- LARKIN M. A., BLACKSHIELDS G., BROWN N. P., CHENNA R., MCGETTIGAN P. A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I. M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J. D., GIBSON T. J., HIGGINS D. G., 2007 Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- LEIPOLD H., MOORE W., 1977 Bovine thrombopathia. In: *First Registry of Animal Models of Thrombosis and Hemorrhagic Diseases*, p. A14.
- LENFFER J., NICHOLAS F. W., CASTLE K., RAO A., GREGORY S., POIDINGER M., MAILMAN M. D., RANGANATHAN S., 2006 OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals): an enhanced platform and integration into the Entrez search interface at NCBI. *Nucleic Acids Res.* **34**: D599–601.
- LENGERKEN G. von, ELLENDORF F., LENGERKEN J. von, 2006 *Landwirtschaftliches Lehrbuch: Tierzucht*. Ulmer (Eugen).
- LESCAI F., FRANCESCHI C., 2010 The Impact of Phenocopy on the Genetic Analysis of Complex Traits. *PLoS ONE* **5**: e11876.
- LESHCHINER I., ALEXA K., KELSEY P., ADZHUBEI I., AUSTIN C., COONEY J., ANDERSON H., KING M., STOTTMANN R. W., HA S., DRUMMOND I., PAW B. H., NORTH T., BEIER D., GOESSLING W., SUNYAEV S., 2012 Mutation mapping and identification by whole genome sequencing. *Genome Research*.
- LEWIS S. E., SEARLE S. M. J., HARRIS N., GIBSON M., LYER V., RICHTER J., WIEL C., BAYRAKTAROGLIR L., BIRNEY E., CROSBY M. A., KAMINKER J. S., MATTHEWS B. B., PROCHNIK S. E., SMITHY C. D., TUPY J. L., RUBIN G. M., MISRA S., MUNGALL C. J., CLAMP M. E., 2002 Apollo: a sequence annotation editor. *Genome Biol.* **3**: RESEARCH0082.
- LIAN L., WANG Y., DRAZNIN J., ESLIN D., BENNETT J. S., PONCZ M., WU D., ABRAMS C. S., 2005 The relative role of PLCbeta and PI3Kgamma in platelet activation. *Blood* **106**: 110–117.
- LIEN S., ROGNE S., BROVOLD M. J., ALESTRÖM P., 1990 A method for isolation of DNA from frozen (A. I.) bulls semen. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **107**: 74–74.
- LILLICRAP D., 2009 Genotype/phenotype association in von Willebrand disease: is the glass half full or empty? *J. Thromb. Haemost.* **7 Suppl 1**: 65–70.

- LIN P., YE R. D., 2003 The lysophospholipid receptor G2A activates a specific combination of G proteins and promotes apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**: 14379–14386.
- LITTINK K. W., KOENEKOOP R. K., BORN L. I. VAN DEN, COLLIN R. W. J., MORUZ L., VELTMAN J. A., ROOSING S., ZONNEVELD M. N., OMAR A., DARVISH M., LOPEZ I., KROES H. Y., GENDEREN M. M. VAN, HOYNG C. B., ROHRSCHEIDER K., SCHOONEVELD M. J. VAN, CREMERS F. P. M., HOLLANDER A. I. DEN, 2010 Homozygosity mapping in patients with cone-rod dystrophy: novel mutations and clinical characterizations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**: 5943–5951.
- LIUZZI J. P., COUSINS R. J., 2004 Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr.* **24**: 151–172.
- LONG A. A., MAHAPATRA C. T., WOODRUFF E. A., ROHRBOUGH J., LEUNG H.-T., SHINO S., AN L., DOERGE R. W., METZSTEIN M. M., PAK W. L., BROADIE K., 2010 The nonsense-mediated decay pathway maintains synapse architecture and synaptic vesicle cycle efficacy. *J Cell Sci* **123**: 3303–3315.
- MACHEN M., MONTGOMERY T., HOLLAND R., BRASELTON E., DUNSTAN R., BREWER G., YUZBASCIYAN-GURKAN V., 1996 Bovine hereditary zinc deficiency: lethal trait A 46. *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**: 219–227.
- MALININ N. L., PLOW E. F., BYZOVA T. V., 2010 Kindlins in FERM adhesion. *Blood* **115**: 4011–4017.
- MAPLETOFT R. J., SCHMUTZ S. M., SEARCY G. P., 2000 A study of the inheritance of a bleeding disorder in Simmental cattle. *Can. Vet. J.* **41**: 791–793.
- MARIANI G., BERNARDI F., 2009 Factor VII Deficiency. *Semin. Thromb. Hemost.* **35**: 400–406.
- MATUKUMALLI L. K., LAWLEY C. T., SCHNABEL R. D., TAYLOR J. F., ALLAN M. F., HEATON M. P., O'CONNELL J., MOORE S. S., SMITH T. P. L., SONSTEGARD T. S., TASSELL C. P. VAN, 2009 Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. *PLoS ONE* **4**.
- MCCARTHY M. I., ABECASIS G. R., CARDON L. R., GOLDSTEIN D. B., LITTLE J., IOANNIDIS J. P. A., HIRSCHHORN J. N., 2008 Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 356–369.
- MCCLELLAN J., KING M.-C., 2010 Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* **141**: 210–217.
- MCEWAN N. A., MCNEIL P. E., THOMPSON H., MCCANDLISH I. A., 2000 Diagnostic features, confirmation and disease progression in 28 cases of lethal acrodermatitis of bull terriers. *J Small Anim Pract* **41**: 501–507.
- MCINNES I. B., SCHETT G., 2011 The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* **365**: 2205–2219.
- MCPHERSON E. A., BEATTIE I. S., YOUNG G. B., 1964 An inherited defect in Friesian calves. *Nord Vet Med* **16**: 533–540.

- MENOUD A., WELLE M., TETENS J., LICHTNER P., DRÖGEMÜLLER C., 2012 A COL7A1 Mutation Causes Dystrophic Epidermolysis Bullosa in Rotes Höhenvieh Cattle. *PLoS ONE* **7**: e38823.
- MEUWISSEN T. H., HAYES B. J., GODDARD M. E., 2001 Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* **157**: 1819–1829.
- MEVES A., STREMMEL C., GOTTSCHALK K., FÄSSLER R., 2009 The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends in Cell Biology* **19**: 504–513.
- MEYERS S. N., MCDANELD T. G., SWIST S. L., MARRON B. M., STEFFEN D. J., O'TOOLE D., O'CONNELL J. R., BEEVER J. E., SONSTEGARD T. S., SMITH T. P., 2010 A deletion mutation in bovine SLC4A2 is associated with osteopetrosis in Red Angus cattle. *BMC Genomics* **11**: 337.
- MORY A., DAGAN E., ILLI B., DUQUESNOY P., MORDECHAI S., SHAHOR I., ROMANI S., HAWASH-MOUSTAFA N., MANDEL H., VALENTE E. M., AMSELEM S., GERSHONI-BARUCH R., 2012 A nonsense mutation in the human homolog of *Drosophila* *rogdi* causes Kohlschütter-Tonz syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **90**: 708–714.
- MORY A., FEIGELSON S. W., YARALI N., KILIC S. S., BAYHAN G. I., GERSHONI-BARUCH R., ETZIONI A., ALON R., 2008 Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III. *Blood* **112**: 2591.
- NAGAMINE K., MATSUDA A., HORI T., 2010 Identification of the gene regulatory region in human *rasgrp2* gene in vascular endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **33**: 1138–1142.
- NAVARRE C. B., KASARI T. R., GREEN R. A., 1995 Platelet function defect in a 5-day-old Simmental calf. *J. Vet. Intern. Med.* **9**: 283–285.
- NEUMANN H. A., 2008 *Das Gerinnungssystem: Physiologie und Pathophysiologie. Eine Einführung.* ABW Wissenschaftsverlag.
- NG P. C., HENIKOFF S., 2001 Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* **11**: 863–874.
- NICKERSON D. A., TOBE V. O., TAYLOR S. L., 1997 PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2745–2751.
- NIELSEN U. S., AAMAND G. P., ANDERSEN O., BENDIXEN C., NIELSEN V. H., AGERHOLM J. S., 2003 Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. *Livestock Production Science* **79**: 233–238.
- O'DELL B. L., 1992 Cysteine-rich intestinal protein (CRIP): a new intestinal zinc transport protein. *Nutr. Rev.* **50**: 232–233.
- O'REILLY S., HÜGLE T., LAAR J. M. van, 2012 T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology* **51**: 1540–1549.

- OKADA Y., TERAO C., IKARI K., KOCHI Y., OHMURA K., *et al.*, 2012 Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nature Genetics* **44**: 511–516.
- OLOFSSON B., KORPELAINEN E., PEPPER M. S., MANDRIOTA S. J., AASE K., KUMAR V., GUNJI Y., JELTSCH M. M., SHIBUYA M., ALITALO K., ERIKSSON U., 1998 Vascular Endothelial Growth Factor B (VEGF-B) Binds to VEGF Receptor-1 and Regulates Plasminogen Activator Activity in Endothelial Cells. *PNAS* **95**: 11709–11714.
- OMMEN C. H. VAN, PETERS M., 2012 The bleeding child. Part I: primary hemostatic disorders. *Eur. J. Pediatr.* **171**: 1–10.
- ONTERU S. K., FAN B., DU Z.-Q., GARRICK D. J., STALDER K. J., ROTHSCHILD M. F., 2012 A whole-genome association study for pig reproductive traits. *Anim. Genet.* **43**: 18–26.
- ORSTAVIK K. H., MAGNUS P., REISNER H., BERG K., GRAHAM J. B., NANCE W., 1985 Factor VIII and factor IX in a twin population. Evidence for a major effect of ABO locus on factor VIII level. *Am J Hum Genet* **37**: 89–101.
- OTANI Y., YAMAGUCHI Y., SATO Y., FURUICHI T., IKENAKA K., KITANI H., BABA H., 2011 PLD4 Is Involved in Phagocytosis of Microglia: Expression and Localization Changes of PLD4 Are Correlated with Activation State of Microglia. *PLoS One* **6**: e27544.
- PASVOLSKY R., FEIGELSON S. W., KILIC S. S., SIMON A. J., TAL-LAPIDOT G., GRABOVSKY V., CRITTENDEN J. R., AMARIGLIO N., SAFRAN M., GRAYBIEL A. M., RECHAVI G., BEN-DOR S., ETZIONI A., ALON R., 2007 A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils, and platelets. *J. Exp. Med.* **204**: 1571–1582.
- PAUSCH H., AIGNER B., EMMERLING R., EDEL C., GÖTZ K.-U., FRIES R., 2013 Imputation of high-density genotypes in the Fleckvieh cattle population. *Genet. Sel. Evol.* **45**: 3.
- PAUSCH H., JUNG S., EDEL C., EMMERLING R., KROGMEIER D., GÖTZ K.-U., FRIES R., 2012 Genome-wide association study uncovers four QTL predisposing to supernumerary teats in cattle. *Animal Genetics*.
- PÉREZ-ALVARADO G. C., KOSA J. L., LOUIS H. A., BECKERLE M. C., WINGE D. R., SUMMERS M. F., 1996 Structure of the cysteine-rich intestinal protein, CRIP. *J. Mol. Biol.* **257**: 153–174.
- PERROTTA S., CUCCIOLLA V., FERRARO M., RONZONI L., TRAMONTANO A., ROSSI F., SCUDIERI A. C., BORRIELLO A., ROBERTI D., NOBILI B., CAPPELLINI M. D., OLIVA A., AMENDOLA G., MIGLIACCIO A. R., MANCUSO P., MARTIN-PADURA I., BERTOLINI F., YOON D., PRCHAL J. T., DELLA RAGIONE F., 2010 EPO receptor gain-of-function causes hereditary polycythemia, alters CD34 cell differentiation and increases circulating endothelial precursors. *PLoS ONE* **5**: e12015.
- PICCHIANTI DIAMANTI A., GERMANO V., BIZZI E., LAGANÀ B., MIGLIORE A., 2011 Interstitial lung disease in rheumatoid arthritis in the era of biologics. *Pulm Med* **2011**: 931342.

- PIRET S. E., ESAPA C. T., GORVIN C. M., HEAD R., LOH N. Y., DEVUYST O., THOMAS G., BROWN S. D. M., BROWN M., CROUCHER P., COX R., THAKKER R. V., 2012 A mouse model of early-onset renal failure due to a xanthine dehydrogenase nonsense mutation. *PLoS ONE* **7**: e45217.
- PROBST F. J., ROEDER E. R., ENCISO V. B., OU Z., COOPER M. L., ENG P., LI J., GU Y., STRATTON R. F., CHINAULT A. C., SHAW C. A., SUTTON V. R., CHEUNG S. W., NELSON D. L., 2007 Chromosomal microarray analysis (CMA) detects a large X chromosome deletion including FMR1, FMR2, and IDS in a female patient with mental retardation. *Am. J. Med. Genet. A* **143A**: 1358–1365.
- PURCELL S., NEALE B., TODD-BROWN K., THOMAS L., FERREIRA M. A. R., BENDER D., MALLER J., SKLAR P., BAKKER P. I. W. DE, DALY M. J., SHAM P. C., 2007 PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**: 559–575.
- QUACKENBUSH J., CHO J., LEE D., LIANG F., HOLT I., KARAMYCHEVA S., PARVIZI B., PERTEA G., SULTANA R., WHITE J., 2001 The TIGR Gene Indices: Analysis of Gene Transcript Sequences in Highly Sampled Eukaryotic Species. *Nucl. Acids Res.* **29**: 159–164.
- REESE M. G., 2001 Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.* **26**: 51–56.
- RICE P., LONGDEN I., BLEASBY A., 2000 EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* **16**: 276–277.
- ROBINSON J. T., THORVALDSDÓTTIR H., WINCKLER W., GUTTMAN M., LANDER E. S., GETZ G., MESIROV J. P., 2011 Integrative genomics viewer. *Nat Biotech* **29**: 24–26.
- RODEGHIERO F., CASTAMAN G., 2001 Congenital von Willebrand disease type 1: definition, phenotypes, clinical and laboratory assessment. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **14**: 321–335.
- ROZEN S., SKALETSKY H., 2000 Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**: 365–386.
- SANDELIN A., WASSERMAN W. W., LENHARD B., 2004 ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res.* **32**: W249–252.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R., 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463–5467.
- SARTELET A., DRUET T., MICHAUX C., FASQUELLE C., GÉRON S., TAMMA N., ZHANG Z., COPPIETERS W., GEORGES M., CHARLIER C., 2012 A splice site variant in the bovine RNF11 gene compromises growth and regulation of the inflammatory response. *PLoS Genet.* **8**: e1002581.
- SAXENA R., SALEHEEN D., BEEN L. F., GARAVITO M. L., BRAUN T., BJONNES A., YOUNG R., HO W. K., RASHEED A., FROSSARD P., SIM X., HASSANALI N., RADHA V., CHIDAMBARAM M., LIJU S., REES S. D., PENG-KEAT NG D., WONG T.-Y., YAMAUCHI T., HARA K., TANAKA Y., HIROSE H., MCCARTHY M. I., MORRIS A. P., BASIT A., BARNETT A. H., KATULANDA P., MATTHEWS D.,

- MOHAN V., WANDER G. S., SINGH J. R., MEHRA N. K., RALHAN S., KAMBOH M. I., MULVIHILL J. J., MAEGAWA H., TOBE K., MAEDA S., CHO Y. S., TAI E. S., KELLY M. A., CHAMBERS J. C., KOONER J. S., KADOWAKI T., DELOUKAS P., RADER D. J., DANESH J., SANGHERA D. K., 2013 Genome-Wide Association Study Identifies a Novel Locus Contributing to Type 2 Diabetes Susceptibility in Sikhs of Punjabi Origin From India. *Diabetes*.
- SEARCY G. P., FROJMOVIC M. M., MCNICOL A., ROBERTSON C., WONG T., GERRARD J. M., 1994 Platelets from bleeding Simmental cattle mobilize calcium, phosphorylate myosin light chain and bind normal numbers of fibrinogen molecules but have abnormal cytoskeletal assembly and aggregation in response to ADP. *Thromb. Haemost.* **71**: 240–246.
- SEARCY G. P., PETRIE L., 1990 Clinical and laboratory findings of a bleeding disorder in Simmental cattle. *Can. Vet. J.* **31**: 101–103.
- SEARCY G. P., SHERIDAN D., DOBSON K. A., 1990 Preliminary studies of a platelet function disorder in Simmental cattle. *Can. J. Vet. Res.* **54**: 394–396.
- SEEFRIED F. R., 2008 Genomic Characterisation and Polymorphism Analysis of Candidate Genes for Milk Production Traits and Association Studies in Three Cattle Breeds.
- SEHGAL V. N., JAIN S., 2000 Acrodermatitis enteropathica. *Clin. Dermatol.* **18**: 745–748.
- SEICHTER D., RUSS I., FÖRSTER M., MEDUGORAC I., 2011 SNP-based association mapping of Arachnomelia in Fleckvieh cattle. *Anim. Genet.* **42**: 544–547.
- SHANKS R. D., DOMBROWSKI D. B., HARPESTAD G. W., ROBINSON J. L., 1984 Inheritance of UMP synthase in dairy cattle. *J. Hered.* **75**: 337–340.
- SHUSTER D. E., KEHRLI M. E. Jr, ACKERMANN M. R., GILBERT R. O., 1992 Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9225–9229.
- STEEMERS F. J., GUNDERSON K. L., 2007 Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform. *Biotechnol J* **2**: 41–49.
- STEFICEK B. A., THOMAS J. S., BAKER J. C., BELL T. G., 1993a Hemorrhagic diathesis associated with a hereditary platelet disorder in Simmental cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**: 202–207.
- STEFICEK B. A., THOMAS J. S., BAKER J. C., BELL T. G., 1993b Hemorrhagic diathesis associated with a hereditary platelet disorder in Simmental cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**: 202–207.
- STÖBER M., 1971 [Parakeratosis in black pied calves. 1. Clinical findings and etiology]. *DTW. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **78**: 257–265.
- STÖBER M., 2002 Erbliches Zinkmalabsorptionssyndrom. In: *Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M. (Ed.), Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*, Blackwell Verlag GmbH Berlin -Wien, pp. 36–38.
- STONE J. C., 2011 Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells. *Genes Cancer* **2**: 320–334.

- SU W., FROHMAN M. A., 2010 Chapter 144 - Phospholipase D. In: *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*, Academic Press, San Diego, pp. 1167–1176.
- SVENSSON L., HOWARTH K., MCDOWALL A., PATZAK I., EVANS R., USSAR S., MOSER M., METIN A., FRIED M., TOMLINSON I., HOGG N., 2009 Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat. Med.* **15**: 306–312.
- SWARTZ J. S., CHATTERJEE S., PARAMBIL J. G., 2010 Desquamative interstitial pneumonia as the initial manifestation of systemic sclerosis. *J Clin Rheumatol* **16**: 284–286.
- TAKAI D., JONES P. A., 2002 Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 3740–3745.
- TAMMELA T., ENHOLM B., ALITALO K., PAAVONEN K., 2005 The Biology of Vascular Endothelial Growth Factors. *Cardiovasc Res* **65**: 550–563.
- TAMMEN I., 2002 Mapping and identification of the gene causing hereditary zinc deficiency in Angus cattle. In: *Proceedings of the 28th International Conference on Animal Genetics, Göttingen*.
- TERAO C., OHMURA K., KAWAGUCHI Y., NISHIMOTO T., KAWASAKI A., TAKEHARA K., FURUKAWA H., KOCHI Y., OTA Y., IKARI K., SATO S., TOHMA S., YAMADA R., YAMAMOTO K., KUBO M., YAMANAKA H., KUWANA M., TSUCHIYA N., MATSUDA F., MIMORI T., 2012 PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum.*
- TESTONI S., BARTOLONE E., ROSSI M., PATRIGNANI A., BRUGGMANN R., LICHTNER P., TETENS J., GENTILE A., DRÖGEMÜLLER C., 2012 KDM2B Is Implicated in Bovine Lethal Multi-Organic Developmental Dysplasia. *PLoS ONE* **7**: e45634.
- THE UNIPROT CONSORTIUM, 2011 Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* **40**: D71–D75.
- THOMPSON P. N., WERF J. H. J. VAN DER, HEESTERBEEK J. A. P., ARENDONK J. A. M. VAN, 2007 The CHRNE 470del20 mutation causing congenital myasthenic syndrome in South African Brahman cattle: prevalence, origin, and association with performance traits. *J. Anim. Sci.* **85**: 604–609.
- THORVALDSDÓTTIR H., ROBINSON J. T., MESIROV J. P., 2013 Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* **14**: 178–192.
- TODD J. A., WALKER N. M., COOPER J. D., SMYTH D. J., DOWNES K., PLAGNOL V., BAILEY R., NEJENTSEV S., FIELD S. F., PAYNE F., LOWE C. E., SZESZKO J. S., HAFLER J. P., ZEITELS L., YANG J. H. M., VELLA A., NUTLAND S., STEVENS H. E., SCHUILENBURG H., COLEMAN G., MAISURIA M., MEADOWS W., SMINK L. J., HEALY B., BURREN O. S., LAM A. A. C., OVINGTON N. R., ALLEN J., ADLEM E., LEUNG H.-T., WALLACE C., HOWSON J. M. M., GUJA C., IONESCU-TÎRGOVIȘTE C., SIMMONDS M. J., HEWARD J. M., GOUGH S. C. L., DUNGER D. B., WICKER L. S., CLAYTON D. G., 2007 Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat. Genet.* **39**: 857–864.

- TRAUTWEIN G., 1971 [Parakeratosis in black pied calves. 2. Pathological findings]. DTW. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. **78**: 265–270.
- TROELSEN J. T., OLSEN J., MØLLER J., SJÖSTRÖM H., 2003 An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology* **125**: 1686–1694.
- UEMOTO Y., NAKANO H., KIKUCHI T., SATO S., ISHIDA M., SHIBATA T., KADOWAKI H., KOBAYASHI E., SUZUKI K., 2012 Fine mapping of porcine SSC14 QTL and SCD gene effects on fatty acid composition and melting point of fat in a Duroc purebred population. *Anim. Genet.* **43**: 225–228.
- VANRADEN P. M., 2008 Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* **91**: 4414–4423.
- VANRADEN P. M., OLSON K. M., NULL D. J., HUTCHISON J. L., 2011 Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J. Dairy Sci.* **94**: 6153–6161.
- VIJVER E. VAN DE, CUYPER I. M. DE, GERRITS A. J., VERHOEVEN A. J., SEEGER K., GUTIÉRREZ L., BERG T. K. VAN DEN, KUIJPERS T. W., 2012 Defects in Glanzmann thrombasthenia and LAD-III (LAD-1/v) syndrome: the role of integrin $\beta 1$ and $\beta 3$ in platelet adhesion to collagen. *Blood* **119**: 583–586.
- VOGT D. W., CARLTON C. G., MILLER R. B., 1988 Hereditary parakeratosis in shorthorn beef calves. *Am. J. Vet. Res.* **49**: 120–121.
- WALSH T., SHAHIN H., ELKAN-MILLER T., LEE M. K., THORNTON A. M., ROEB W., RAYYAN A. ABU, LOULUS S., AVRAHAM K. B., KING M.-C., KANAAN M., 2010 Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am. J. Hum. Genet.* **87**: 90–94.
- WANG F., KIM B.-E., DUFNER-BEATTIE J., PETRIS M. J., ANDREWS G., EIDE D. J., 2004 Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter. *Hum. Mol. Genet.* **13**: 563–571.
- WANG X., WURMSER C., PAUSCH H., JUNG S., REINHARDT F., TETENS J., THALLER G., FRIES R., 2012 Identification and dissection of four major QTL affecting milk fat content in the German Holstein-Friesian population. *PLoS ONE* **7**: e40711.
- WATERHOUSE A. M., PROCTER J. B., MARTIN D. M. A., CLAMP M., BARTON G. J., 2009 Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**: 1189–1191.
- WEISSER P., KORTE W., ROHR S., KIOSSIS E., RIESEN W., STOLLA R., 2010 „Hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder“ (HTS) beim Deutschen Fleckvieh. *Prakt Tierarzt* **9**: 236–244.
- WHITLOCK B. K., KAISER L., MAXWELL H. S., 2008 Heritable bovine fetal abnormalities. *Theriogenology* **70**: 535–549.

- WINDSOR P., AGERHOLM J., 2009 Inherited diseases of Australian Holstein-Friesian cattle. *Aust. Vet. J.* **87**: 193–199.
- WONG A. K., RUHE A. L., ROBERTSON K. R., LOEW E. R., WILLIAMS D. C., NEFF M. W., 2012 A de novo mutation in KIT causes white spotting in a subpopulation of German Shepherd dogs. *Anim. Genet.*
- YOSHIKAWA F., BANNO Y., OTANI Y., YAMAGUCHI Y., NAGAKURA-TAKAGI Y., MORITA N., SATO Y., SARUTA C., NISHIBE H., SADAKATA T., SHINODA Y., HAYASHI K., MISHIMA Y., BABA H., FURUICHI T., 2010 Phospholipase D family member 4, a transmembrane glycoprotein with no phospholipase D activity, expression in spleen and early postnatal microglia. *PLoS ONE* **5**: e13932.
- YUZBASIYAN-GURKAN V., BARTLETT E., 2006 Identification of a unique splice site variant in SLC39A4 in bovine hereditary zinc deficiency, lethal trait A46: An animal model of acrodermatitis enteropathica. *Genomics* **88**: 521–526.
- ZHANG W., CUI H., WONG L.-J. C., 2012 Application of Next Generation Sequencing to Molecular Diagnosis of Inherited Diseases. *Topics in Current Chemistry*.
- ZHAO X., DITTMER K. E., BLAIR H. T., THOMPSON K. G., ROTHSCHILD M. F., GARRICK D. J., 2011 A novel nonsense mutation in the DMP1 gene identified by a genome-wide association study is responsible for inherited rickets in Corriedale sheep. *PLoS ONE* **6**: e21739.
- ZHAO Z. L., WANG C. F., LI Q. L., JU Z. H., HUANG J. M., LI J. B., ZHONG J. F., ZHANG J. B., 2012 Novel SNPs of the mannan-binding lectin 2 gene and their association with production traits in Chinese Holsteins. *Genet. Mol. Res.* **11**: 3744–3754.
- ZHOU X., STEPHENS M., 2012 Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nat. Genet.* **44**: 821–824.
- ZIMIN A. V., DELCHER A. L., FLOREA L., KELLEY D. R., SCHATZ M. C., PUIU D., HANRAHAN F., PERTEA G., TASSELL C. P. VAN, SONSTEGARD T. S., MARÇAIS G., ROBERTS M., SUBRAMANIAN P., YORKE J. A., SALZBERG S. L., 2009 A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol.* **10**: R42.
- ZIMMERMAN G. A., 2009 LAD syndromes: FERMT3 kindles the signal. *Blood* **113**: 4485–4486.

9 Appendix

9.1 Erläuterung der Thrombozytenaggregationsmessung

Die phänotypische Identifizierung betroffener Tiere sowie die Messung der Thrombozytenaggregation wurden von Mitarbeitern der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München durchgeführt. Die Untersuchung der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten erfolgte nach dem Prinzip der Impedanz-Aggregometrie mit einem Multiplate® 5.0 Analyzer, (Verum Diagnostica, München, Deutschland). Dazu wird frisches Vollblut (maximale zwei Stunden nach der Entnahme) in eine spezielle Messkammer gegeben und mit verschiedenen gerinnungsfördernden Agonisten (ADP, Kollagen) versetzt. Zur Überprüfung und Reproduzierbarkeit des Verfahrens erfolgt die Messung zeitgleich an zwei Sensoreinheiten der Multiplate-Zelle (insgesamt vier Sensordrähte pro Messzelle). Bei einer ungestörten Koagulation lagern sich die aktivierten Thrombozyten an die Oberfläche der Sensordrähte der Kammer. Es kommt zu einer Erhöhung des elektrischen Widerstands. Diese Widerstandsänderung wird als Maß der Plättchenaggregation verwendet. Bei einer gestörten Thrombozytenfunktion wird keine Veränderung des Widerstandes registriert. Die Bewertung der Thrombozytenfunktion erfolgt über den AUC-Wert (area under the curve), welche vom Aggregationsmaximum und der Aggregationsgeschwindigkeit beeinflusst und in der Einheit AU*min oder U*min (10 AU = 1 U) angegeben wird.

Vor der Messung der Thrombozytenaggregation wurde von allen betroffenen Tieren ein Blutbild zur Erfassung der Thrombozytenzahl erstellt. Durch eine Verminderung der Blutplättchenanzahl kann es zu einer verlangsamt bis gar keiner Plättchenaggregation kommen und die Impedanzmessung somit zu einer falsch-positiven Identifizierung betroffener Tiere führen (HANKE *et al.* 2010). Die Laborbefunde aller in die Untersuchung eingegangenen Rinder lagen innerhalb der Referenzbereiche, so dass eine Thrombozytopenie sowie eine Störung der sekundären Hämostase als Krankheitsursache von den untersuchenden Veterinärmedizinern ausgeschlossen werden konnte. Die Impedanzmessung der Blutproben der untersuchten Tiere konnte eine Störung der Thrombozytenfunktion nachweisen. Im Vergleich mit gesunden Tieren zeigten die Blutplättchen erkrankter Rinder keine Aggregation nach der Zugabe der Plättchenaktivatoren Kollagen und ADP (Abbildung 9.1). Aufgrund der klinischen Untersuchung und der Befunde der Impedanzmessung wurde die Diagnose einer Thrombozytopathie gestellt.

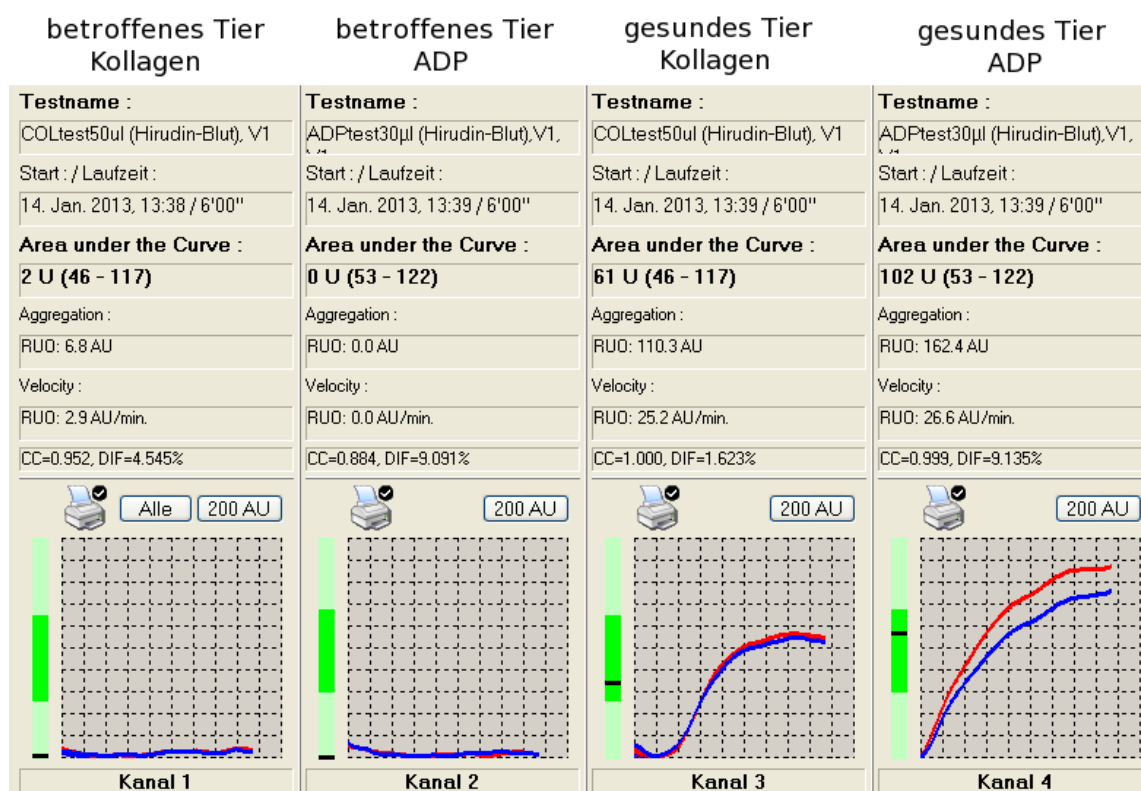


Abbildung 9.1: Ergebnis der Impedanzmessung mit Kollagen und ADP eines betroffenen und gesunden Tieres

Dargestellt ist die Aggregation über Aggregationskurven, wobei die Zunahme des elektrischen Widerstands an den Sensoren vom System in frei gewählten Aggregationseinheiten (AU, y-Achse) umgerechnet und pro Zeiteinheit (Minuten, x-Achse) aufgezeichnet wird. Die blaue bzw. rote Linie entsprechen den beiden Sensoreinheiten der Multiplate-Messzelle zur doppelten Bestimmung der Thrombozytenaggregation.

9.2 Puffer

PBS	(50 mM Phosphat-gepufferte Salzlösung, 150 mM NaCl, pH 7,2)
TE	(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)
TBE 10x	(900 mM Tris-HCl, 900 mM Borate, 20 mM EDTA, pH 8,3)
PKS 1x	(10 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % SDS)
PK 1x	(20 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 100 mM NaCl)

9.3 Übersicht der verwendeten Primer zur Re-Sequenzierung

Tabelle 9.1: Übersicht der verwendeten Primer mit Sequenz, Orientierung und genomischer Lokalisation

<i>LAB_ID</i>	<i>GEN</i>	<i>SEQUENZ</i>	<i>ORIENTIERUNG</i>	<i>POSITION</i>
8092	<i>SLC39A4</i>	CCCTTGTCGTTTCAGCTTCTC	FORWARD	UPSTREAM
8093		CAGTTTAGGCAGGGTGAGGA	REVERSE	UPSTREAM
8094		AATGCCTCTATGGGCTAACA	FORWARD	UPSTREAM
8095		GGGCAAACAGGGCTTAGATA	REVERSE	UPSTREAM
8096		GTTCCCATTGACCCAGATTT	FORWARD	UPSTREAM
8097		TCGGCTGAGTTGACTGAAGA	REVERSE	UPSTREAM
8098		ATGGCCTTCAGACAGCAATC	FORWARD	UPSTREAM
8099		AGACAGCAGGGTCAGCAGAT	REVERSE	EXON 1
8100		CTCGCTGGGTGAGAGGTA	FORWARD	EXON 1
8101		TCTGCCTGGAACCATTATCA	REVERSE	INTRON 1
8102		CAAGCCCACTCTCCTCAACT	FORWARD	INTRON 1
8103		TCTCAGACCCTCTCCTCCA	REVERSE	INTRON 2
8104		CTCCTGGTCCTGCTTGAGAG	FORWARD	EXON 2
8105		TCACCGTCCAGTGTGATGTT	REVERSE	EXON 3
8106		ACGCTGCTTGAGACATTGAG	FORWARD	INTRON 2
8107		CATTCCGTACACAGCCATGA	REVERSE	EXON 5
8108		GACGACAGTCCTCTGGGAAA	FORWARD	EXON 4
8109		CAGACCGAGTCTGGGAGAAG	REVERSE	INTRON 5
8110		GTGCTGTGAGGGAAGAGGAT	FORWARD	INTRON 5
8111		GGCAGCAAGAGGTTGAAGAG	REVERSE	EXON 7
8112		CACCCAGTCCAGTGTCTCT	FORWARD	INTRON 6
8113		GGCCGTGTAGATTAGGCTCA	REVERSE	INTRON 9
8114		CCTGCCCTGAGCCTAATCTA	FORWARD	INTRON 8
8115		TACTGGAGTGGGTTGCCATT	REVERSE	INTRON 10
8116		CGACTCATGGCTCAGACAGT	FORWARD	INTRON 10
8117		TCCTCATAAGCAGCAGCAG	REVERSE	EXON 12
8118		CTCCTCTCCTGCTCCACAA	FORWARD	EXON 12
8119		GCAACTGTGACGGCTAAACA	REVERSE	DOWNSTREAM
8120		CAGACAGACAGGTCGCACAT	FORWARD	DOWNSTREAM
8121		GTGGCTCAGTGGCAAAGAAT	REVERSE	DOWNSTREAM
8122		TTAATAGTTGTGGCGCATGG	FORWARD	DOWNSTREAM
8123		TGTTCTCCTGCCTCCAAATC	REVERSE	DOWNSTREAM
8124		GCCCATATGGAGACAAACCA	FORWARD	DOWNSTREAM
8125		GCTTCAGCATCAGTCCTTCC	REVERSE	DOWNSTREAM

9 Appendix

<i>LAB_ID</i>	<i>GEN</i>	<i>SEQUENZ</i>	<i>ORIENTIERUNG</i>	<i>POSITION</i>
9017	<i>CRIP1</i>	GGATGTCCACACAGCCTTCT	FORWARD	UPSTREAM
9018		TTTGTAGTCCTGCCAAGAGC	REVERSE	UPSTREAM
9019		GTGTGAGGTCTGCTCAGTGC	FORWARD	UPSTREAM
9020		GTCTCCGTTGCCCTCAG	REVERSE	UPSTREAM
9021		CGACACTGACCGACAGGAG	FORWARD	UPSTREAM
9022		ACCTACCAGGGCATTCTCAG	REVERSE	EXON 1
9023		AGACTGGGATGTCCCTTG	FORWARD	EXON 1
9024		ACACCTCTTTGCTGCACTTG	REVERSE	EXON 2
9025		CGAGAGTGGACCAGATGACC	FORWARD	EXON 1
9026		GGTTTCCGCGTCTGTTTCTA	REVERSE	INTRON 2
9027		CGCTATCTCGCCCATTCC	FORWARD	INTRON 2
9028		CTGCCCCTATCCCTCAGC	REVERSE	INTRON 3
9029		GGCAGAGGGGTCTGGAGAG	FORWARD	INTRON 2
9030		GTCTTCCAAGTGTCCGCATT	REVERSE	EXON 6
9031		CTGTCCTCCAGGCCGATG	FORWARD	EXON 6
9032		AGAGCCAAAGCAGCAGTGAC	REVERSE	DOWNSTREAM
9033		GGGCTGTCTGGAAACTCTCA	FORWARD	DOWNSTREAM
9034		CTGGCTGACCCACTTCTTG	REVERSE	DOWNSTREAM
9101		GCCAGAGCCCAGTACTCAAG	FORWARD	UPSTREAM
9102		CTGCGTTTCAGATCCACTCA	REVERSE	UPSTREAM
9103		GTCTCTGAGCAGCTCCGTTT	FORWARD	UPSTREAM
9104		CTGGCCTAGGACCTGTTCTG	REVERSE	UPSTREAM
9105		CAGACAAGAAGGGGTGAAGG	FORWARD	UPSTREAM
9106		CTGGTCTTTGGCTGGATGTG	REVERSE	UPSTREAM
9107		GCTGGCTTCCCTGATTCC	FORWARD	UPSTREAM
9108		CTCCTTTCCCTTTGGGGTA	REVERSE	UPSTREAM
9109		GGATGTCCACACAGCCTTCT	FORWARD	UPSTREAM
9110		ATGCTGGAAGGACACAGTC	REVERSE	UPSTREAM
9111		GGCTGGAGCAGGAAGAAGTC	FORWARD	UPSTREAM
9112		CTAGGCCATCCTCCGCTAAC	REVERSE	EXON 1
9113		CCAAGTGCCCAAGTGCAGCAA	FORWARD	EXON 2
9114		TGAAAGTGTGGCTCTCGGCTC	REVERSE	EXON 5
9281	<i>CRIP2</i>	GTACGGACCATGGCCTCCAA	FORWARD	EXON 1
9282		TCTCTGGCCCTGGACTTGCA	REVERSE	EXON 8
9557		TTGGAGGCCATGGTCCGTAC	REVERSE	EXON 1
9558		AGTACACGGTCTTGTCGCAC	REVERSE	EXON 1
9559		GGCAAGTGGGGCATAAATAA	REVERSE	EXON 8
9560		GGTAGCAAAAGTCCCAGCAC	REVERSE	EXON 8
9607		AGGCCAATGGGCGAG	FORWARD	UPSTREAM
9608		CGAGTGAAAGGGCAGAGAAA	REVERSE	INTRON 1
9609		CGGCCGAGGCCAAT	FORWARD	UPSTREAM
9610		CACATGTCCGTGGGTGG	REVERES	INTRON 1
9611		TCAGCGTCTTGCTGCAGTGC	REVERSE	EXON 2
9612		AAGGTGAGCTCCCTGGG	FORWARD	EXON 2
9613		CCAAACAGCGTGGCATAGCA	REVERSE	EXON 3
9614		TGATGGAAAGCCCTTCTGCC	FORWARD	EXON 3
9615		GCTTTCCGCTCCTCAGTTCG	REVERSE	EXON 4
9616		CCGGCTCCTACATCTACGAG	FORWARD	EXON 4
9617		TGCAGCGAGGACACATGTTG	REVERSE	EXON 5
9618		CAACATGTGTCTCGCTGCA	FORWARD	EXON 5
9619		TCTTCCCACAGCGCTCG	REVERSE	EXON 6

9 Appendix

<i>LAB_ID</i>	<i>GEN</i>	<i>SEQUENZ</i>	<i>ORIENTIERUNG</i>	<i>POSITION</i>
9620		AGAAGGTGACGTCTCTGGG	FORWARD	EXON 6
9621		CGAAGAGTATCCGTAGCAGGG	REVERSE	EXON 7
9622		CCGTGGGCAGCTACATCTAT	FORWARD	EXON 8
9623		CTCTCTGGCCCTGGACTTG	REVERSE	EXON 8
9624		GCCACTGTTCTGACCTTGAG	REVERSE	INTRON 1
9697		AAGTCCACCTGGGGAACC	FORWARD	INTRON 6
9698		GCTCCACCTCAGAAAGGTCA	REVERSE	EXON 8
9699		CCTGTCTCCGGGTGTATCTG	FORWARD	EXON 8
9700		CTCCCCACCTCCCTCTAGTC	REVERSE	DOWNSTREAM
9701		GTGCTGGGACTTTTGCTACC	FORWARD	EXON 8
9702		G TTCAGGCAGGAGCACTAGG	REVERSE	DOWNSTREAM
9703		CAGGACACCTGAGGCAGAAT	FORWARD	DOWNSTREAM
9704		CCTGCTTCCTGGAGAATGAG	REVERSE	DOWNSTREAM
9705		CAGCAGCAAGCTCTGCAC	FORWARD	INTRON 1
9706		CCAAGGATGACGAGAGAAGG	REVERSE	INTRON 1
9707		CACAGACAGACAGTGGCACA	FORWARD	INTRON 1
9708		ACTTGGCATCCTGAGGTCAC	REVERSE	INTRON 1
9709		GCTCCAGCAGAAAACAAAG	FORWARD	INTRON 1
9710		GAGTTCTGGCTCCAGTGACC	REVERSE	INTRON 1
9711		CCTAGCCTCCTAGGGTGGAG	FORWARD	INTRON 1
9712		AGACCAGCTGCTAAGGGTCA	REVERSE	INTRON 1
9713		CTTCCAGTCGGGAGGATTC	FORWARD	INTRON 1
9714		AAGGGCTTTCATCATGCTA	REVERSE	INTRON 2
9715		TGTGGGAAGACGCTGACC	FORWARD	EXON 6
9716		AGAAGGGGACCACAGACTCC	REVERSE	INTRON 6
9717		TAGCTCTGACATGGGGCTCT	FORWARD	UPSTREAM
9718		CACTGCCATTTCCATGAGTG	REVERSE	UPSTREAM
9719		ATTCAGAGACACCGGACACC	FORWARD	UPSTREAM
9720		CATCTCCCAAGGGCTCTTTC	REVERSE	UPSTREAM
9721		ACCTGGTGTCCAGCAAAGAG	FORWARD	UPSTREAM
9722		CGAGAGAAACTGCTGGAAGG	REVERSE	UPSTREAM
9723		CAGAGCCTGCAGTACACACG	FORWARD	UPSTREAM
9724		GGGCACTCACCGAAGTACAC	REVERSE	EXON 1
9425	<i>RasGRP2</i>	CTTCCTAGCCACGTCTCAGC	FORWARD	UPSTREAM
9426		TCAGGCAATTACCTCCCATC	REVERSE	UPSTREAM
9427		TTGCTTTCTGGGGTAGAGGA	FORWARD	UPSTREAM
9428		GCAGGGTTATTTGGGAACC	REVERSE	UPSTREAM
9429		GGGAGAAATTCCTCTGAGGTC	FORWARD	UPSTREAM
9430		TCTTTCTGCAGCATGTGGAC	REVERSE	INTRON 1
9431		GCATCCTGCAGCCTCTTTAG	FORWARD	INTRON 1
9432		GGGGCTCGCTTACAGACTC	REVERSE	INTRON 2
9433		TAGATGATTCCGGGAAGGTG	FORWARD	INTRON 1
9434		TGCAGTGAGCTGGAGTTGTC	REVERSE	EXON 3
9435		ATCCCCTGCCTCCTTTTCTA	FORWARD	INTRON 2
9436		CACAGGAAGTTGTCCAGCAA	REVERSE	INTRON 4
9437		CCGCACCAITTTGCTCTTAAT	FORWARD	INTRON 4
9438		GAGTCCTTTGCCAGAGATGC	REVERSE	INTRON 4
9439		AGTGTCCCTGCCAGTGTCTC	FORWARD	INTRON 4
9440		TAGCAGTGGGTTAGGGGAAA	REVERSE	INTRON 6
9441		GGGGTCATCACACACTTCGT	FORWARD	EXON 6
9442		ACTTCCAAGTGGTCCAGTG	REVERSE	INTRON 7

9 Appendix

<i>LAB_ID</i>	<i>GEN</i>	<i>SEQUENZ</i>	<i>ORIENTIERUNG</i>	<i>POSITION</i>
9443		CCTGACTCTGCTCAGGCTCT	FORWARD	INTRON 7
9444		CCCGGAACCCAGAGTTAAT	REVERSE	INTRON 8
9445		AGGCCAGTGGGTGTGATAAG	FORWARD	INTRON 8
9446		CCTTCTGTCAACCGAGCATT	REVERSE	INTRON 10
9447		GGACACGTCCATAGTGGTCA	FORWARD	INTRON 10
9448		TAGCAAGAGTCCCCAGGAAG	REVERSE	INTRON 11
9449		TAGGCTGGGTTAAGCTGGTG	FORWARD	INTRON 11
9450		TCAATCAGCATGCCTCTCTG	REVERSE	INTRON 13
9451		GGGGCAATTGTCAAGGAGTA	FORWARD	INTRON 13
9452		ACCCTGGAAAAGTTTCCGTA	REVERSE	INTRON 14
9453		ATGGTTCTGCTTCTGGGATG	FORWARD	INTRON 14
9454		CCCCAAGATTCTAGCACATGA	REVERSE	DOWNSTREAM
9455		GGGTAGGGGCTGTAAATCA	FORWARD	DOWNSTREAM
9456		CCCACTCTCAGATGGCTGTC	REVERSE	DOWNSTREAM
9635	<i>FERMT3</i>	TAAGGCCCTGCTCTCTTGAA	FORWARD	UPSTREAM
9636		TCCAGTAAGCACAGGAAGCA	REVERSE	UPSTREAM
9637		ACAGGCCAGAGAGGGAAGAT	FORWARD	UPSTREAM
9638		GGTGAACCCAGGTCAGAAAA	REVERSE	INTRON 1
9639		GTGCGGCAACCTAGACTTTC	FORWARD	INTRON 1
9640		CCTATAAACACCCGCAGCTC	REVERSE	EXON 2
9641		GAGAGGGGTCCGAGTTTCTC	FORWARD	INTRON 1
9642		GACCAGGTCCCAAGTCAC	REVERSE	INTRON 2
9643		CTAAGACCCCAAGGACCAG	FORWARD	INTRON 2
9644		TTGTTGAGGCCTCTTGCTTT	REVERSE	INTRON 2
9645		CAGGTTAGCCAGCAAACAGC	FORWARD	INTRON 2
9646		AACAACAGCTTGGAAGGAT	REVERSE	INTRON 3
9647		CTCTCCAGGCCATGGTG	FORWARD	EXON 3
9648		TCTTGTTCCAAGAGGGAGCTG	REVERSE	EXON 5
9649		CTTCTCAGACAGTGCCAGA	FORWARD	EXON 5
9650		TCTCCCTCACAACCCTTGAG	REVERSE	INTRON 6
9651		GCAGGGCACACAGTAGACAA	FORWARD	INTRON 6
9652		GTTGCTCAGGGCTAAATCCA	REVERSE	EXON 8
9653		CATCAACAAGCTGTCCAGA	FORWARD	EXON 8
9654		AGTTGGAGACAGGTGAGAGCA	REVERSE	INTRON 10
9655		ACCTCAAGGGTGAGTGATGG	FORWARD	EXON 10
9656		CTGTCCGCTGTAGGCTGAG	REVERSE	EXON 12
9657		ACCCAGGAGCAGCAGTAT	FORWARD	EXON 12
9658		TGCCCTATCAAGGAGACAG	REVERSE	INTRON 12
9659		CTCTGGGAGGGGTCACAGT	FORWARD	INTRON 12
9660		TCTACAGGCTCGGAAAGTGG	REVERSE	INTRON 13
9661		ACTATTTGGCTGACGCTGCT	FORWARD	INTRON 13
9662		GTGAGCTGCAGGAAGAGGTC	REVERSE	EXON 15
9663		GCACATCAACGTGGCTTTTA	FORWARD	EXON 15
9664		TCTCAGGAAAGCCCCTCTCT	REVERSE	DOWNSTREAM
9665		TTGTTGGGTCATCCCTCTC	FORWARD	DOWNSTREAM
9666		CCGCCAGGTTTGATAACTA	REVERSE	DOWNSTREAM
9667		CCTGTGTGCAGACTCACCTG	FORWARD	DOWNSTREAM
9668		GTGGTGGACACCAATGTGAA	REVERSE	DOWNSTREAM
9784	<i>PLD4</i>	TTGTGGGATAGGGTGGTCTC	FORWARD	INTRON 4
9785		TTCTACCACAGGGGCGTTAC	REVERSE	INTRON 6
9867		GAAGAAAGCACAGGGGTCTG	FORWARD	INTRON 1

9 Appendix

LAB_ID	GEN	SEQUENZ	ORIENTIERUNG	POSITION
9868		GGCAGCCTAGGGATGGTATT	REVERSE	INTRON 1
9869		CTCCAGCAGTCATTGTGTGG	FORWARD	INTRON 1
9870		ACTAAAGCCCCCTTCTCAGG	REVERSE	INTRON 2
9871		AGGGGTGGTCTGTCTCAGG	FORWARD	INTRON 2
9872		ACCAACTGACCCAGAAGG	REVERSE	INTRON 3
9873		CAGGCTGAGGAGTGCTCTTG	FORWARD	INTRON 3
9874		TGGGAAGACGAGTCGTTGAC	REVERSE	EXON 4
9875		AGGACCTGCGATCTGTAGCA	FORWARD	EXON 4
9876		CCCACCTTACAGGTGGGAGA	REVERSE	INTRON 5
9877		GTCCTGAAAAGCCGAGGT	FORWARD	EXON 5
9878		AGGGTGGGATACAACTGAGC	REVERSE	INTRON 6
9879		GTGGATTCCATGATGCTGCT	FORWARD	INTRON 6
9880		ACACCATCACTGGTGCTCTG	REVERSE	INTRON 7
9881		GAACCTCCAGGCACATCG	FORWARD	INTRON 7
9882		CCTACAGGCGAGAAGACAGG	REVERSE	INTRON 8
9883		TCCTCTACGCCTCGGTGAT	FORWARD	EXON 8
9884		CGTGACCATGAACTTGCTGT	REVERSE	EXON 10
9885		CATGGACGTGGTAAGAATGC	FORWARD	EXON 9
9886		CCCTGCCAAACACAGTCC	REVERSE	EXON 11
9887		CTGGTGGTCAGCCAGAGG	FORWARD	EXON 11
9888		CTGAGACAGGCCTCTGAACC	REVERSE	DOWNSTREAM

Auflistung der verwendeten Primer mit interner Identifikationsnummer (Lab_Id), Sequenz in 5'-3-Orientierung und der Lage der Primer in der genomischen Organisation der Gene

9.4 Übersicht der analysierten Fleckvieh-Tiere

Tabelle 9.2: Übersicht der Tiere für die Untersuchung des BHZD-ähnlichen Syndroms

<i>Labornummer</i>	<i>LOM</i>	<i>Status</i>	<i>LOM Vater</i>
G4	276000943707915	Fall	276000941809001
G5	276000943379113	Fall	276000919709877
G13	276000944724486	Fall	276000935895523
G15	276000944163830	Fall	276000913319530
G17	276000944243327	Fall	276000919709877
G19	276000944914578	Fall	040000864481742
G31	276000946937505	Fall	040000641071516
G34	276000945835900	Fall	276000943406063
G1	276000935680219	Anlageträger	276000915390754
G2	276000938058498	Anlageträger	276000916160758
G3	276000938072388	Anlageträger	276000919709877
G12	276000940028325	Anlageträger	o. A.
G16	276000917427087	Anlageträger	276000919569726
G18	276000934019242	Anlageträger	276000918049458
G22	276000938989120	Anlageträger	276000937158675
G35	276000942256131	Anlageträger	o. A.
3821	276000930934918	Anlageträger	276000807702732
4029	276000932557204	Anlageträger	276000919322930
7561	276000919709877	Anlageträger	040000040568233
7591	276000915079575	Anlageträger	040000040568233
7750	276000937927603	Anlageträger	276000919709877
7802	276000937992845	Anlageträger	276000919709877
7819	276000937961731	Anlageträger	276000918966545
7878	276000938153941	Anlageträger	276000919709877
3854	276000931567964	Kontrolle	276000911403939
3861	276000933117507	Kontrolle	276000910310337
8145	276000929276244	Kontrolle	276000929081239
8146	276000925265555	Kontrolle	276000926800806
8147	276000929189864	Kontrolle	276000929015959
8148	276000910915308	Kontrolle	276000915512806
8160	276000918594707	Kontrolle	276000915424397
8186	276000912851233	Kontrolle	276000809706945
8188	276000911474933	Kontrolle	276000914411965
8193	276000928504510	Kontrolle	CH711620016730
8198	276000910794565	Kontrolle	276000916835898
8232	276000926428551	Kontrolle	276000925714495

Lab_IDs entsprechen der internen Labornummer, LOM ist die Nummer der Lebendohrmarke;

Tabelle 9.3: Übersicht der Tiere der Thrombozytopathie-Untersuchung

<i>Lab_ID</i>	<i>LOM_Tier</i>	<i>Status</i>	<i>LOM_Vater</i>	<i>Genotypisierung</i>	<i>Genotyp c.T911C</i>
TCP_1	276000944062178	Fall	276000936487534	x	CC
TCP_3	276000944421616	Fall	276000936487534	x	CC
TCP_5	276000940793017	Fall	276000940680380	x	CC
TCP_7	276000944940967	Fall	276000937694254	x	CC

9 Appendix

<i>Lab_ID</i>	<i>LOM_Tier</i>	<i>Status</i>	<i>LOM_Vater</i>	<i>Genotypisierung</i>	<i>Genotyp c.T911C</i>
TCP_9	276000945592583	Fall	276000937694254	x	CC
TCP_10	276000945592582	Fall	276000937694254	x	CC
TCP_11	276000814624894	Fall	o. A.	x	CC
TCP_13	276000946485312	Fall	276000936487534	x	CC
TCP_14	276000945823820	Fall	276000935844146	x	CC
TCP_15	276000987038195	Fall	o. A.	x	CC
TCP_16	276000938983859	Fall	276000913319530	x	CC
TCP_19	276000986805941	Fall	o. A.	x	CC
TCP_21	276000986805944	Fall	o. A.	x	CC
TCP_24	276000943271156	Fall	276000942556124	x	CC
TCP_26	276000987008536	Fall	o. A.	x	CC
TCP_27	276000943199935	Fall	276000936474567	x	CC
TCP_28	276000945823888	Fall	276000943608500	x	CC
TCP_29	276000946209957	Fall	o. A.	x	CC
TCP_43	276000943256614	Fall	276000941165221	x	CC
TCP_48	276000944251768	Fall	276000936647732	x	CC
TCP_53	040000541289616	Fall	o. A.	x	CC
TCP_58	276000945419611	Fall	276000934586859	x	CC
TCP_62	276000945839077	Fall	276000937694254	x	CC
TCP_65	276000987180764	Fall	276000941035849	x	CC
TCP_67	276000946953339	Fall	276000937694254		CC
TCP_68	276000947010926	Fall	276000944684909	x	CC
TCP_70	276000943908110	Fall	276000936487534	x	CC
TCP_71	276000892924926	Fall	o. A.	x	CC
TCP_72	276000946096670	Fall	276000937694254	x	CC
TCP_81	276000947700757	Fall	o. A.	x	CC
TCP_82	276000947480877	Fall	o. A.	x	CC
TCP_84	276000947413509	Fall	o. A.	x	CC
TCP_86	276000947422183	Fall	o. A.	x	CC
TCP_88	276000947643091	Fall	o. A.		CC
TCP_89	276000947643092	Fall	o. A.		CC
TCP_91	276000947482492	Fall	o. A.		CC
TCP_92	276000947292590	Fall	o. A.		CC
TCP_94	276000945656966	Fall	o. A.		CC
TCP_96	276000941946953	Fall	o. A.		CC
TCP_97	276000987193446	Fall	o. A.		CC
TCP_98	276000946081205	Fall	o. A.		CC
TCP_99	276000947349568	Fall	o. A.		CC
TCP_100	276000947396859	Fall	o. A.		CC
TCP_101	276000947302455	Fall	o. A.		CC
TCP_2	276000944062180	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_4	276000944421614	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_6	276000937875601	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_8	276000945362350	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_12	276000813284032	Kontrolle	o. A.		CT
TCP_17	276000986792775	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_18	276000946449661	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_20	276000986043385	Kontrolle/Anlageträger	o. A.		CT
TCP_22	276000985789171	Kontrolle/Anlageträger	o. A.		CT
TCP_23	276000943255375	Kontrolle/Anlageträger	o. A.		CT
TCP_32	276000946485645	Kontrolle	276000943726467		TT

9 Appendix

<i>Lab_ID</i>	<i>LOM_Tier</i>	<i>Status</i>	<i>LOM_Vater</i>	<i>Genotypisierung</i>	<i>Genotyp c.T911C</i>
TCP_33	276000940376131	Kontrolle	276000932627221		CT
TCP_34	276000935533685	Kontrolle	276000918151241		TT
TCP_44	276000946136219	Kontrolle	276000938063849		TT
TCP_45	276000986880842	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_46	276000946686926	Kontrolle	276000936487481		TT
TCP_55	040000294523609	Kontrolle/Anlageträger	o. A.		CT
TCP_59	276000939971178	Kontrolle	276000933663105		TT
TCP_63	276000945819036	Kontrolle	276000938895304		TT
TCP_73	276000946096669	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_75	276000942846904	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_76	276000946291479	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_85	276000974713507	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_93	276000947292592	Kontrolle	o. A.		TT
TCP_25	276000938370435	o.A./Anlageträger	276000918923365		CT
TCP_30	276000974581705	o.A./Anlageträger	40000754776647		CT
TCP_31	276000974575849	o. A.	o. A.		TT
TCP_35	276000946431481	o.A.	276000943683608	x	CC
TCP_36	276000942023256	o.A./Anlageträger	276000932627221		CT
TCP_37	276000943666034	o.A.	276000935785025	x	CC
TCP_38	093821261627600	o.A.	o. A.	x	CT
TCP_39	276000947115272	o.A.	276000934586859	x	CC
TCP_40	276000945843476	o.A.	276000937293240	x	CC
TCP_41	276000945805535	o.A.	276000937025219	x	CC
TCP_42	276000946626753	o.A.	276000934586859	x	CC
TCP_47	276000941962422	o. A.	276000912392042		TT
TCP_49	040000758725718	o. A.	o. A.	x	TT
TCP_50	276000946647951	o.A.	276000943465062	x	CC
TCP_51	o. A.	o.A.	o. A.		CC
TCP_52	276000536001556	o. A.	o. A.	x	TT
TCP_54	040000554019818	uneindeutig	o. A.	x	CT
TCP_56	o. A.	o.A.	o. A.		TT
TCP_57	276000769751119	o. A.	o. A.	x	TT
TCP_60	o. A.	o.A.	o. A.		CC
TCP_61	o. A.	o.A.	o. A.		CT
TCP_64	276000946591969	o. A.	o. A.	x	TT
TCP_66	276000987180761	uneindeutig	276000937293240		TT
TCP_69	276000947407094	uneindeutig	040000198174714	x	CC
TCP_74	276000946953337	uneindeutig	o. A.		TT
TCP_83	276000947480880	uneindeutig	o. A.		TT
TCP_87	276000947422186	uneindeutig	o. A.		TT
TCP_90	276000947643094	uneindeutig	o. A.		TT
TCP_95	276000942169483	uneindeutig			TT
TCP_77	276000940140453	BNP	276000913357571		CT
TCP_78	276000945872431	BNP	276000942868836		CC
TCP_79	276000946419265	BNP	o. A.		CC
TCP_80	276000945066901	BNP	o. A.		CT

Lab_IDs entsprechen der internen Labornummer; LOM ist die Nummer der Lebendohrmarke; Tiere mit unbekanntem (o.A.) Status oder uneindeutiger Impedanzmessung wurden in weiteren Analyse gesondert betrachtet, BNP: Tiere, die im Rahmen der bovinen neonatalen Panzytopenie-Untersuchung auffällig wurden, der BNP-Verdacht aber nicht bestätigt werden konnte

Tabelle 9.4: Übersicht der Tiere der genomweiten Re-Sequenzierung

<i>Tiername</i>	<i>LOM</i>	<i>detektierte SNPs</i>	<i>Abdeckung</i>
Balbo	276000925265555	12.153.311	7,52
Boss	276000911474933	11.119.813	4,17
Dago	276000938263111	10.844.370	7,40
Dirteck	276000926189400	10.783.332	5,21
Egol	276000910915308	13.135.106	8,66
Esmeralda	276000938065319	11.444.837	22,80
Gebal	276000910794565	10.927.823	4,13
Halling	276000919587582	10.913.745	3,89
Haxl	276000979317838	11.024.446	7,39
Hexer/Mister	276000943707915	11.057.223	7,94
Hodscha	276000804179455	11.485.986	7,92
Holzer	276007600026785	10.366.957	10,10
Horb	276000915581022	11.202.221	6,38
Horror	276000809706945	11.973.910	8,63
Horwein	276000912851233	11.388.099	7,54
Humid	276000918912889	11.284.700	5,67
Humlang	276000915040032	11.120.912	8,04
Mandela	276000935684041	11.032.611	6,52
Martl-De	276000931098195	11.218.625	5,71
Morgengrau	276000940823906	10.439.394	6,31
Morwel	276000912851741	11.315.205	7,74
Poldi	276000913325437	11.355.922	8,50
Postillion	276000926428551	11.173.663	3,39
Propeller	276000920747734	11.199.652	6,73
Ralbo	276000911825633	10.410.846	4,05
Redad	756711620016730	11.758.611	8,67
Regio	276000918174246	11.278.677	5,62
Renger	276000915732780	10.978.649	6,18
Renner	276000928504510	11.573.124	8,78
Report	276000919598352	11.141.707	7,32
Rexon	276000913008210	11.137.069	4,66
Romanek	276000910865689	11.772.720	10,69
Romen	276000912971290	10.942.453	4,43
Romulus	276000929189864	11.385.846	9,50
Samurai	276000913892370	11.143.174	5,08
Sport	276000910950070	9.203.508	9,16
Streif	276000929276244	11.349.671	8,54
Utnach	276000919253926	11.168.945	7,30
Valero	276000941364903	11.648.936	9,82
Vanstein	276000934586859	10.399.343	7,65
Waterberg	276000932739095	11.248.824	7,38
Weinold	276000933663105	11.236.650	8,10
Zahner	276000933038755	11.753.825	5,20

LOM ist die Nummer der Lebendohrmarke, Abdeckung beschreibt die durchschnittliche Anzahl DNA-Fragmente je Position im Genom des Tieres

9.5 Übersicht der identifizierten Polymorphismen

Tabelle 9.5: Polymorphismen der genomweiten Re-Sequenzierung im PLD4-Gen

<i>Position</i>	<i>Referenz-Allel</i>	<i>Substitution</i>	<i>Effekt</i>	<i>Region</i>	<i>AS</i>
70995055	A	G		UPSTREAM	
70995190	T	G		UPSTREAM	
70995369	C	T		UPSTREAM	
70995425	G	A		UPSTREAM	
70995442	G	A		UPSTREAM	
70995495	G	A		UPSTREAM	
70995660	A	C		UPSTREAM	
70995701	G	A		UPSTREAM	
70996255	G	C		INTRON 1	
70996586	C	T		INTRON 1	
70996630	C	A		INTRON 1	
70996860	A	G		INTRON 1	
70997271	A	G		EXON 2 / 5'-UTR	
70997368	C	T		EXON 2 / 5'-UTR	
70997485	C	A		INTRON 2	
70997544	C	T		INTRON 2	
70997578	G	A		INTRON 2	
70997704	A	G		INTRON 2	
70997737	C	T		INTRON 2	
70998217	G	T		INTRON 2	
70998440	G	A		INTRON 2	
70998482	A	G		INTRON 2	
70998752	C	T		INTRON 2	
70998886	G	A		INTRON 2	
70999121	T	G		INTRON 2	
70999311	C	A		INTRON 2	
70999953	T	C		INTRON 3	
71000073	G	T		INTRON 3	
71000096	T	C		INTRON 3	
71000439	C	T	SYNONYM	EXON 4	L79
71000459	A	G	MISSENSE	EXON 4	D86G
71000520	A	G	SYNONYM	EXON 4	L106
71000526	C	T	SYNONYM	EXON 4	D108
71000583	C	T	SYNONYM	EXON 4	D127
71000637	C	T		INTRON 4	
71000641	G	T		INTRON 4	
71000794	A	C		INTRON 4	
71001232	G	A	NONSENSE	EXON 6	W215X
71001755	C	T		INTRON 6	
71002227	A	G	SYNONYM	EXON 7	P272
71002351	C	T		INTRON 7	
71002403	G	A		INTRON 7	
71002465	G	A		INTRON 7	
71002607	G	T		INTRON 7	
71003949	C	T	MISSENSE	EXON 10	A401V
71003968	A	G		INTRON 10	
71004001	G	A		INTRON 10	

<i>Position</i>	<i>Referenz-Allel</i>	<i>Substitution</i>	<i>Effekt</i>	<i>Region</i>	<i>AS</i>
71004188	T	G		INTRON 10	
71004422	G	A	MISSENSE	EXON 11	A455T
71004519	G	A		EXON 11 / 3'-UTR	
71004767	C	T		DOWNSTREAM	
71004861	A	C		DOWNSTREAM	

Tabellarische Übersicht der identifizierten Polymorphismen von 43 genomweit re-sequenzierten Tieren. Die angegebenen Position entspricht der Position im UMD3.1-Assembly, das Referenz-Allel entspricht der Base der bovinen Referenzsequenz. Der Effekt entspricht der Auswirkung des Austauschs auf die Aminosäuresequenz, AS ist der Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz mit Positionsangabe

Tabelle 9.6: Übersicht der identifizierten SNPs aller Gene mit Identifikationsnummer

<i>Gen</i>	<i>SNP_Id</i>	<i>Position</i>	<i>ss/rs-Nummer</i>
<i>SLC39A4</i>	3958	BTA14:1.706.176	rs211079601
	3959	BTA14:1.718.954	rs208785177
	3960	BTA14:1.720.167	rs110458977
	3961	BTA14:1.720.373	rs207729531
	3962	BTA14:1.720.865	rs109113991
	3963	BTA14:1.720.989	rs110993258
	3964	BTA14:1.721.108	rs109062923
	3965	BTA14:1.721.593	rs109053825
	3966	BTA14:1.722.194	rs41663790
	3967	BTA14:1.722.853	rs134275924
<i>CRIP1</i>	4203	BTA21:71.392.819	rs209416544
	4204	BTA21:71.392.554	rs211124030
	4205	BTA21:71.392.514	rs208092178
	4206	BTA21:71.392.424	rs210097503
	4207	BTA21:71.392.416	rs211371798
	4208	BTA21:71.392.402	rs208330753
	4209	BTA21:71.392.316	rs209611269
	4210	BTA21:71.392.125	rs211614136
	4211	BTA21:71.391.905	rs208954768
	4212	BTA21:71.391.707	rs209492590
	4213	BTA21:71.391.628	rs211123411
	4214	BTA21:71.391.541	rs208783822
	4215	BTA21:71.391.412	rs210386621
	4216	BTA21:71.391.394	rs207980281
	4217	BTA21:71.391.262	rs208794392
	4218	BTA21:71.390.809	rs210006850
	4219	BTA21:71.390.793	rs207970620
	4220	BTA21:71.390.176	rs209439542
4221	BTA21:71.389.922	rs210859365	
4222	BTA21:71.389.848	rs207581070	
<i>CRIP2</i>	4223	BTA21:71.375.537	ss749737434
	4224	BTA21:71.375.757	ss749737435
	4225	BTA21:71.375.849	ss749737436
	4226	BTA21:71.376.630	ss749737437
	4227	BTA21:71.376.749	ss749737438
	4228	BTA21:71.376.682	ss749737439
	4229	BTA21:71.377.057	ss749737440

9 Appendix

<i>Gen</i>	<i>SNP_Id</i>	<i>Position</i>	<i>ss/rs-Number</i>
	4230	-	ss749737441
	4231	BTA21:71.379.940	ss749737442
	4232	BTA21:71.379.396	ss749737443
	4233	BTA21:71.379.296	ss749737444
	4234	BTA21:71.378.965	ss749737445
	4235	BTA21:71.378.881	ss749737446
	4236	BTA21:71.378.687	ss749737447
	4237	BTA21:71.378.576	ss749737448
	4238	BTA21:71.377.960	ss749737449
	4239	BTA21:71.377.701	ss749737450
	4240	BTA21:71.377.545	ss749737451
	4241	-	ss749737452
	4242	-	ss749737453
	4243	-	ss749737454
	4244	-	ss749737455
	4245	-	ss749737456
	4246	-	ss749737457
	4247	-	ss749737458
	4248	-	ss749737459
	4249	BTA21:71.382.125	ss749737460
	4250	BTA21:71.382.454	ss749737461
	4251	BTA21:71.382.583	ss749737462
	4252	BTA21:71.382.978	ss749737463
<i>PLD4</i>	4289	BTA21:70.997.271	ss702002533
	4290	BTA21:70.997.368	ss702002533
	4291	BTA21:70.999.953	ss702002559
	4292	BTA21:71.000.073	ss702002561
	4293	BTA21:71.000.096	ss702002563
	4294	BTA21:71.000.520	ss702002568
	4295	BTA21:71.000.526	ss702002570
	4296	BTA21:71.000.637	ss702002573
	4297	BTA21:71.000.641	ss702002575
	4298	BTA21:71.000.794	ss702002577
	4255	BTA21:71.001.232	ss702002579
	4299	BTA21:71.002.227	ss702002582
	4300	BTA21:71.002.351	ss702002584
	4301	BTA21:71.002.403	ss702002586
	4302	BTA21:71.002.465	ss702002588
	4303	BTA21:71.002607	ss702002589
	4304	BTA21:71.003.968	ss702002593
	4305	BTA21:71.004.001	ss702002595
	4306	BTA21:71.004.188	ss702002597
<i>RasGRP2</i>	4259	BTA29:43.603.564	ss705826043
	4260	BTA29:43.603.131	ss705826042
	4261	BTA29:43.602.616	ss705826039
	4262	BTA29:43.602.507	ss705826038
	4263	BTA29:43.601.279	ss705826035
	4264	BTA29:43.599.412	ss705826032
	4265	BTA29:43.599.378	ss705826031
	4266	BTA29:43.599.204	ss705826030
	4267	BTA29:43.598.915	ss705826028

9 Appendix

<i>Gen</i>	<i>SNP_Id</i>	<i>Position</i>	<i>ss/rs-Nummer</i>
	4268	BTA29:43.591.338	-
	4269	BTA29:43.591.325	ss705826003
	4270	BTA29:43.591.189	ss705826002
<i>FERMT3</i>	4271	BTA29:43.125.232	ss705823126
	4272	BTA29:43.125.269	ss705823127
	4273	BTA29:43.125.303	ss705823128
	4274	BTA29:43.126.069	-
	4275	BTA29:43.126.425	ss705823134
	4276	BTA29:43.127.556	-
	4277	BTA29:43.130.942	ss705823190
	4278	BTA29:43.132.143	ss705823197
	4279	BTA29:43.132.158	ss705823198
	4280	BTA29:43.141.875	ss705823294
	4281	BTA29:43.142.179	ss705823297
	4282	BTA29:43.153.443	ss705823369
	4283	BTA29:43.153.394	ss705823368
	4284	BTA29:43.153.326	ss705823366
	4285	BTA29:43.152.912	ss705823362
	4286	BTA29:43.151.559	-

Übersicht der durch Re-Sequenzierung identifizierten Polymorphismen der analysierten Gene. Die SNP_Id entspricht der internen Identifikationsnummer., die Position entspricht der Lokalisation des SNPs auf dem bovinen UMD3.1-Assembly. Die ss- bzw. rs-Nummer entspricht der Identifikationsnummer des SNPs in NCBI.

9.6 Übersicht der Gene des homozygoten Bereichs auf BTA29

Tabelle 9.7: Genhalt auf BTA29:41.698.900 bp – 43.375.960 bp

<i>Gen</i>	<i>Gen_Id</i>	<i>Start</i>	<i>Stopp</i>
<i>ARL2</i>	NM_001038079	43.845.378	43.853.178
<i>ATG2A</i>	NM_001205966	43.708.739	43.728.792
<i>ATL3</i>	NM_001098978	42.658.661	42.617.154
<i>BAD</i>	NM_001035459	43.201.979	43.190.201
<i>BATF2</i>	NM_001192561	43.830.937	43.825.077
<i>CCDC88B</i>	NM_001192279	43.250.522	43.265.507
<i>CDC42BPG</i>	NM_001102502	43.696.730	43.678.395
<i>CDCA5</i>	NM_001076270	43.960.477	43.943.684
<i>CHRM1</i>	NM_001244609	41.930.451	41.919.551
<i>COX8A</i>	NM_174024	42.876.362	42.876.691
<i>EHD1</i>	NM_001015578	43.708.219	43.703.977
<i>ESRRA</i>	NM_001191373	43.221.839	43.228.313
<i>FAU</i>	NM_174731	43.992.333	43.990.462
<i>FERMT3</i>	NM_001037606	43.126.404	43.142.480
<i>FFR</i>	NM_00112093	43.968.660	43.981.535
<i>FKBP2</i>	NM_001113256	43.159.739	43.162.661
<i>FLRT1</i>	XM_002699324	43.048.588	43.051.537
<i>GPHA2</i>	NM_001193166	43.775.105	43.774.445
<i>GPR137</i>	NM_001113295	43.203.589	43.206.667
<i>HRASLS5</i>	XM_003588038	42.388.562	42.385.374
<i>KCNK4</i>	XM_002699381	43.207.070	43.219.401
<i>LGALS12</i>	XM_002699372	42.397.689	42.406.535
<i>LOC100294785</i>	XM_002699325	43.008.146	43.008.581
<i>LOC100295716</i>	PSEUDOGEN	42.323.097	42.323.360
<i>LOC100296625</i>	XM_002699375	42.477.202	42.455.514
<i>LOC100335569</i>	XM_002699378	42.738.827	42.734.926
<i>LOC100335678</i>	-	43.588.560	43.576.199
<i>LOC100336631</i>	XM_002699377	42.532.634	42.542.039
<i>LOC100336656</i>	-	43.454.675	43.152.059
<i>LOC100336747</i>	XM_002699386	43.742.263	43.747.878
<i>LOC100336760</i>	-	43.758.028	43.748.580
<i>LOC507750</i>	XM_003588044	43.917.761	43.918.591
<i>LOC513662</i>	NM_001205765	42.781.095	42.792.409
<i>LOC519202</i>	XM_002699319	41.971.535	41.944.850
<i>LOC522784</i>	XM_002699301	42.188.815	42.225.093
<i>LOC532368</i>	XM_002699299	42.063.213	42.080.302
<i>LOC536947</i>	XM_003588050	42.453.220	42.446.851
<i>LOC614402</i>	XM_002699376	42.531.402	42.518.577
<i>LOC617154</i>	XM_003588052	43.164.093	43.163.494
<i>LOC618367</i>	NM_001105009	42.478.123	42.495.308
<i>LOC788530</i>	NM_001242632	43.965.171	43.964.453
<i>MACROD1</i>	NM_001046509	43.092.842	42.890.799
<i>MAP4K2</i>	NM_001206275	43.661.356	43.648.492
<i>MARK2</i>	NM_001102182	42.829.261	42.865.915
<i>MEN1</i>	NM_001076161	43.668.039	43.661.730
<i>MRPL49</i>	NM_001014871	43.992.489	43.996.386
<i>NAA40</i>	NM_001099004	43.032.947	43.046.882

9 Appendix

<i>Gen</i>	<i>Gen_Id</i>	<i>Start</i>	<i>Stopp</i>
<i>NAALADL1</i>	NM_001100308	43.936.186	43.919.976
<i>NRXN2</i>	NM_001192922	43.576.128	43.476.403
<i>NUDT22</i>	NM_001038680	43.149.460	43.146.856
<i>OTUB1</i>	NM_001034719	42.882.593	42.889.929
<i>PLA2G16</i>	NM_001075280	42.608.367	42.578.108
<i>PLCB3</i>	NM_001192423	43.170.432	43.189.303
<i>PPP2R5B</i>	NM_001075232	43.765.388	43.774.237
<i>PRDX5</i>	NM_174749	43.229.777	43.232.885
<i>PYGM</i>	NM_175786	43.617.817	43.606.017
<i>RASGRP2</i>	NM_001099946	43.602.499	43.590.193
<i>RCOR2</i>	NM_001206075	42.872.337	42.867.835
<i>RTN3</i>	NM_182657	42.665.400	42.725.838
<i>SFI</i>	NM_001081614	43.636.775	43.623.210
<i>SLC22A10</i>	NM_001101917	42.287.600	42.313.710
<i>SLC22A11</i>	XM_002699382	43.416.170	43.433.282
<i>SLC22A24</i>	XM_002699300	42.155.545	42.120.556
<i>SLC22A6</i>	NM_001001143	41.990.431	41.982.590
<i>SLC22A8</i>	NM_001206246	42.019.996	41.999.712
<i>STIP1</i>	NM_001035492	43.111.546	43.124.096
<i>SYVN1</i>	NM_001101899	44.003.325	43.996.314
<i>TM7SF2</i>	NM_174622	43.981.731	43.986.407
<i>TRMT112</i>	NM_001045981	43.229.598	43.228.263
<i>VEGFB</i>	NM_174487	43.150.980	43.157.756
<i>ZFPL1</i>	NM_001076272	43.960.635	43.964.484
<i>ZNHIT2</i>	NM_001040560	43.987.804	43.986.566

Grau unterlegt sind Gene, die nachweislich an der Blutgerinnung oder Blutgefäßbildung beteiligt sind; Gen_Id entsprechen der NCBI_Accession_Nummer (Stand Mai 2013), Start- und Stoppinformation entsprechen dem Transkriptionsstart bzw. -stop und basieren auf dem UMD3.1-Assembly

9.7 Übersicht der Genidentifikationsnummern (NCBI)

Tabelle 9.8: Übersicht der Genidentifikationsnummern der verwendeten Proteine/Gene

<i>Gen</i>	<i>Spezies</i>	<i>Gen_Id</i>	<i>Art</i>
<i>SLC39A4</i>	MENSCH	NP_060237	ISOFORM 1
	MENSCH	NP_130849	ISOFORM 2
	MAUS	NP_082340	
	RATTE	NP_001071137	
<i>CRIP1</i>	MENSCH	NP_001302	
	MAUS	NP_031789	
	RATTE	NP_001128405	
<i>CRIP2</i>	MENSCH	NP_001303	ISOFORM 1
	MAUS	NP_077185	
	RATTE	NP_071946	
	RIND	NM_001079649	
<i>PLD4</i>	MENSCH	NP_620145	
	MAUS	NP_849242	
	RATTE	NP_001119760	
<i>RASGRP2</i>	MENSCH	NP_722541	
	MAUS	NP_035372	
	RATTE	NP_001076446	
<i>FERMT3</i>	MENSCH	NP_113659	SHORT FORM
	MENSCH	NP_848537	LONG FORM
	MAUS	NP_722490	
	RATTE	NP_001121015	

Aufgeführt sind die Genidentifikationsnummern (Gen_Id) aus NCBI der Proteine, die für multiple Proteinalignments verwendet wurden. Für CRIP2 ist zudem die verwendete Genidentifikationsnummer des bovinen Gen angegeben.

9.8 Schematische Darstellung der Hämostase

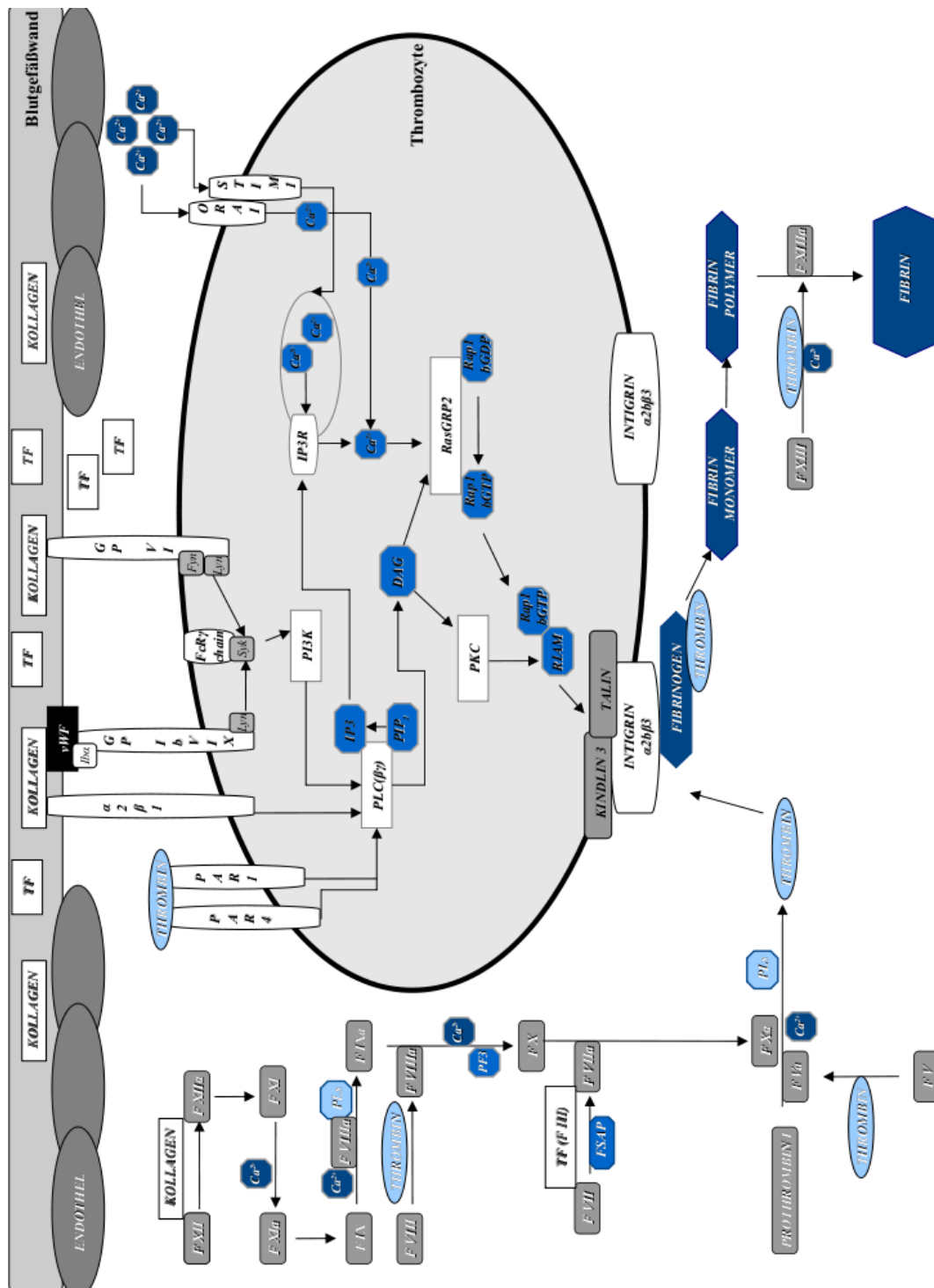


Abbildung 9.2: Schematische Darstellung der Teilbereiche der Hämostase

Dargestellt sind die Prozesse der Blutgerinnung aufgrund einer Verletzung der Blutgefäßwand.

Die Stillung von Blutungen (Blutgerinnung oder Hämostase) wird in zwei Phasen unterteilt, die **primäre** und die **sekundäre Hämostase**, die fließend ineinander übergehen. Der erste Schritt der primären Hämostase ist die Kontraktion der Blutgefäße (Vasospasmus), die zu einer Verengung der Gefäßabschnitte vor der Verletzung und somit zu einer Verlangsamung des Blutflusses führt. Der zweite

Schritt setzt sich aus der Adhäsion der Thrombozyten an Komponenten der Blutgefäßwand (s.u.) und der Aggregation der Thrombozyten zur Thrombenbildung zusammen.

Während des primären Adhäsionsprozesses bindet ein thrombozyten-spezifischer Glykoproteinkomplex (GPIb/V/IX) an dem Plasmaprotein von-Willebrand-Faktor (vWF), welcher über Kollagen mit die Gefäßwand assoziiert vorliegt. Die Aktivierung des Glykoproteinrezeptors löst eine Signalkaskade innerhalb der Thrombozyten aus, welche die Bindung von Fibrinogen an den Integrin α Ib β 3-Rezeptor zur Folge hat.

GPIb/V/IX: Dieser Komplex besteht aus den leuzinreichen Glykoproteinen GPIb α , GPIb β , GPIX, GPV im Verhältnis 2:4:2:1. vWF bindet an das freigelegte Kollagen. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des vWF, wodurch er fähig ist, die GPIb α -Untereinheit des Komplexes zu binden. Durch diese Bindung werden die Thrombozyten näher an die Gefäßwand gebracht und andere Rezeptoren können ans Kollagen binden.

Alpha2beta1 (GPIa/IIa): Ist ein Rezeptor mit hoher Affinität für (Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg)-Sequenz des Kollagens. Durch die Bindung des Rezeptors ans Kollagen wird er von einem geringen zu einem hohen Affinitätsstatus verschoben.

GPVI: Durch die Bindung des Rezeptors an das Kollagen der Endothelmembran kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zur Aktivierung der Src-Tyrosinkinase Fyn und Lyn, welche am zytoplasmatischen Ende des Rezeptors gebunden sind. Innerhalb der Plättchenmembran ist der Rezeptor mit der FcR γ -Kette assoziiert, welche das ITAM-Motiv (Immunorezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv) zur Signaltransduktion bzw. Signalverstärkung trägt. Fyn und Lyn phosphorylieren die ITAMs, welche die Tyrosinkinase Syk rekrutieren. Syk induziert eine Signalkaskade über PI3K, wodurch die PLC aktiviert wird.

PLC: Aktivierte PLC hydrolysiert PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) zu PI₃ (Inositol 1,4,5-triphosphat) und membrangebundenes DAG (1,2-Diacylglycerol). IP₃ bindet an seinen Rezeptor IP₃R am DTS (dense tubular system), wodurch es zu einem Efflux von Ca²⁺ ins Zytoplasma kommt.

STIM1: Stromal interaction molecule ist ein DTS-Transmembranprotein, das bei hohem Ca²⁺-Level mit Ca²⁺-Ionen besetzt ist. Wenn die Ca²⁺-Konzentration sinkt, translokiert STIM1 an die Plasmamembran, wo es mit ORAI1 assoziiert. Dadurch kommt es zu einem Ca²⁺-Einfluss in Zytoplasma.

Die Prozesse der sekundären Hämostase werden je nach Aktivierungsweg in das intrinsische und extrinsische System unterteilt. Das intrinsische System wird durch die Aktivierung des Faktor XII (**FXII** → **FXIIa**) an Kollagen eingeleitet. Der aktivierte Faktor XII (**FXIIa**) aktiviert Faktor XI (**FXI**) zu FXIa. **FXIa** aktiviert Faktor IX zu FIXa. **FIXa** aktiviert zusammen mit **FVIIIa**, Kalzium und Phospholipiden (**PLs**) Faktor X (**FX**) zu **FXa**. Mit der Aktivierung dieses Faktors münden das extrinsische und das intrinsische System ineinander.

Bei dem extrinsische System, dessen Aktivierung direkt nach der Gewebsläsion erfolgt, wird der Faktor VII (**FVII**) über die Bindung der freigelegten Komponenten der Blutgefäßwand (Gewebsfaktor (**TF**), **FIII**) und die Bindung von **FSAP** (FVII-aktivierende Protease) aktiviert (**FVIIa**). **FVIIa** aktiviert Faktor X (**FX** → **FXa**). Der aktivierte FX (**FXa**) aktiviert zusammen mit FVa, Phospholipiden (**PLs**) und Kalzium das **Prothrombin I** aus dem nach einer katalytischen Spaltung **Thrombin** wird. Mit Hilfe von Thrombin erfolgt die Umwandlung von **Fibrinogen** zu **Fibrin** und so letztendlich die Bildung des Thrombus. (JURK und KEHREL 2005a; b; NEUMANN 2008; KEHREL 2008; BROOS et al. 2011, 2012)

9.9 Nukleotidsequenzen re-sequenzierter Gene mit Bereichen unbekannter Sequenzinformation

```
>CRIP1_cDNA_1360 bp
00001 ACCCGTCCAT CGGCCTCCCC ACCAACCCCC GACGCCCGCC ATGAGGCCGC
00051 AGGCCTCTGC TGGTTAGCGG AGGATGGCCT AGGGCCCTGC AGCCCGCCAG
00101 CGCCCGCACC CTTGGCCTTC CCCCATTCCT GGAGCGGGTG GGCCTGCAG
00151 TCTCCGCCTG GCACCGGAGA GGCTCCGGCC GCCCCCCCCC CCCCCCCCCC
00201 CGTCCTTGA CGTCGGACTT GGACCTCTCC GCCCTCTGCC CTCGGCGCTT
00251 CCTGCGGAGA TAAGGACCCC TCCCCCGCCG CCGCGCAGCT CCACGGAGGC
00301 CTGGGCGTTG CCGCACAGAC TCCCCCACC CCCGACATCC CGCAGAATCT
00351 CCAGCCCTGC CGTTGATGGG TGTCGCCGCC TTGGGAGGGG ATGTCCCGTC
00401 TCGGAATCTC AGGGGAGTTC CGCTGCGGTC CGACGGACAT CCAGGGGCGG
00451 GCCGAAGCGG GGCTCGGTGG AGACTGGGAT GTCCCTTGGG GGTAGGAGAC
00501 GGGCGGGGCA ACCTTCTGGC CCCACGCGTG ATGAAGCGG AGGGCAGTTC
00551 GTGGGGGAGG GCTACCAGGC TGAGAATGCC CTGGTAGGTG CCCCCGCCC
00601 TGTATCTAGG GAAAGGCCTG GAAAGGTACG ACACGCTCAT TTGCATCTCT
00651 CTGCATTATA GCGGTTACCT TCGGGGCTCC AGCACTCTGA GCGGGGGGTG
00701 GGGCGGGGCG CGTGGGGTGC TCTCTCCCGC TCTGGGGAGC CTCCGCCAG
00751 AGTCCGGGGC GAGGGCGGGG CTCTCCCGG GTTCCAGCCC AGTCCAGTCG
00801 GCGAGAGTGC CCGCCGACCT CCTGGACCCC CTCGGACCGC ACTCTGCCGT
00851 CGGCCAGGCC CGGGTCTTGC CCCAAGGCGA GAGTGGACCA GATGACTTT
00901 CTTGGCCTGT TGGCTGGAAT CCGAGGCCTC CGGGTCCAAT CCAGCGCTCC
00951 GGTCTGCTCC CGCCTGGCCA TCTGCCCCGA TCCGGCGCCA CCATGCCCAA
01001 GTGCCCAAAG TGCAGCAAAG AGGTGTA CTT TGCTGAGCGG GTGACTTCCC
01051 TGGGGAAGGA CTGGCATCGG CCTTGTCTCA AGTGTGAGAA ATGTGGGAAG
01101 ACGCTGACCT CCGGGGGTCA TGCCGAGCAT GAAGGCAAGC C TACTGCAA
01151 CCACCCCTGC TACGCGGCCA TGTTTGGACC CAAAGGCTTT GGGCGGGCG
01201 GAGCCGAGAG CCACACTTTC AAGTAAACCC AGGTTTTGGA GACCCATCTC
01251 CAGCTGCCCC CTGGGCTGCT GTCCCTCAGG CCGATGGCAG GCCTTTCTCC
01301 ACAGGCACCT GGGGCTCCCC TTATAGACCC CCCCTGCCCT CAATAAATGC
01351 GGACACTTGG
```

```
>CRIP2_genomische Sequenz_5076 bp
00001 GCAGCGGCTG CGGCGGGGAG ACGGGCGCGC GCGGAGAACG CGGGGCGACT
00051 GGGCGTACGG ACCATGGCCT CCAAGTGCCC CAAGTGCGAC AAGACCGTGT
00101 ACTTCGGTGA GTGCCCGGGC CCGGCCGCC TTGGGGTCAG CTCCCCGCTG
00151 CAGAGCCGCG AGCCCCCGC GCTCGTCGGC CAGCGCCCGG CCGCCACCCC
00201 AGGATGCCCG GCCCGGATCC GGCTCGTCCG CTGCCACGC GGGTGC GGCC
00251 GGAGGGTGA GCGGCGACGA GCTGGGGGCG GCCACGCCCG AACCCCCGAA
00301 GTAGCCGATG GGGGCGAGGC GGGGGCCCGA GGCCTGGCGG GCGGGGCGC
00351 GTGGACCCTC CAGAAAGCGG CCGGGCTTGG GGGAGCGCTC TGCGCTCGCG
00401 GGCCGATCGC GGTCCTGCCT GGCTGTGCC AGCGGGGCGG GGTCGGGCGC
00451 AGCAGCAAGC TCTGCACGCT TCCAGCGCGC TCCCGCCTTT CTCTGCCCTT
00501 TCACTCGGAC CCCAGTCGCG CCACCCACGG ACATGTGGCC GGGCCGGCTG
00551 GCTTCATGAC CCTCAACCCC AGCCCCGACC TCTGCCACG CTGGGCCAGG
00601 TCTAGGCTCT GTCTGGATTC AGCCCATGCG GGGGCGACCT TGGCCTCCAC
00651 CTCTTACGCG TTCCGACACG CTCTTTTCT TGGCGCAAGT TCCCCCTGGA
00701 CTCTCTGCG GTTGGGGTGA GGAACGAACC CTCACAAGCA GGAGAGGGCG
00751 CTGGAACCCA GGTGGCCAGG CCCCCTACCT CCTCAAGGTC AGAACAGTGG
00801 CATCCGGGAG GAGAGAGTGG GGAGGAGAGC CTGTCTCTGC CTGGAAGCCC
00851 CCTGGGTTGG CAGAGACTGC CTCCCATGGG CGCACCACTC GCTGGCACTC
00901 CTAACCTGGT GTCTGGCTCA CTCCCCACT CTCCCTCACC CTGGCTGGTC
00951 CTCTCCCCAA CTTTGCCAGG GTCCCTGCC ACTAAGCCTC CCACCAACTC
```

01001	CCGCACAGAC	AGACAGTGGC	ACAAGTCAGA	AGAGCAGGAG	AGACAGGGAC
01051	AGAGAGAAGA	CCCTTCTCTC	GTCATCCTTG	GGGCAGTGGC	CTGGGTCTGA
01101	GGTGGGGACT	GGCCGAGGTG	AAGATGGCCC	CTTGGTTTCC	CTGCGGACGG
01151	GTGGGAGGAG	GAGGCGCAGG	CCGTTGTTTG	CTGTTCCAG	AGGGGAGGGA
01201	CCGGATTTGG	CCTGGAGTGC	TTCTGGCCTG	GCTGGAGGCC	GCGGAGCTTC
01251	CGGCTGCCTG	CTGGGGATCC	CGCCCAGCCC	TCGGTCCCCA	TTCGGACAGG
01301	ACTCATCCCT	GTAAGGCTCA	GGGTAGGGGC	CAGCCCCAGG	GTTGTCCTGC
01351	CAGCCCCGCT	GCCCCACATCT	TTACTCCGGG	CCAGGCCAGC	TCAGGGACGG
01401	GCCGACAGTC	CCGTGGACAA	CCCGGAAAAG	CGTTTCTGCC	TGCTTGGGCG
01451	GCTGCTGGCT	CCCAGCAGAA	AACAAAGGCT	GGCTTCTCTC	TTGGTCTGGA
01501	GGCCCTGGTG	GAGGAAGGGG	CGGAGCCAGG	AGGCTGCCAC	CCCCAGTCCG
01551	GCTGCACCCC	AGTGGGTGCA	CAGAGGAGCC	GGGCCAGGGC	ACCCCGCAGT
01601	GACCTCAGGA	TGCCAAGTCT	TTGCGTCCCC	GACAATGGCA	GCTGGGTGGG
01651	AGCTGGTTCC	TTTCCAAGCC	ATTAGACTCA	GTCGATTCTG	CCTTCCCAAC
01701	GTGGGCTGGT	AACGTGTGGC	CATTGACCTG	CCCGGTGGGT	CCGAGGGTCA
01751	TTCCCTGACC	CCCCAGTGGC	CCCAGCCTAA	CAGCTAGCCA	GAGCAGCATG
01801	GTTCTGGCTG	CCCTGAACCG	CAGCTGCCTC	GGCAACCGCT	GGCCAGCGGG
01851	AGAGCTGGGA	GAGGATGCCA	GTCTGGCATG	GGATCTGAGC	CTGCCTTGGG
01901	CTCAGCCAGC	TCCTGTCTGC	CCTGGCATGG	ACCTGCGGGA	GGCCTGGCCA
01951	GTCTGAGCCC	TAGCCTCCTA	GGGTGGAGTG	GCCAGAAAGA	TCTATAAGCC
02001	TGTGGTGCCC	CTGGGAAGGG	GATGGTGGGT	GGGGGTCCCA	GAGGCTGCCC
02051	CTGGCCAGGC	CAGCAGGTGC	CACCAGGGTC	ACTGGAGCCA	GAACTCCAAG
02101	CCCCGAACCT	GAGCCACCAG	GAGCACAAGC	TGCCCTCCAG	GAGCCTCCCA
02151	GGCCGCCTGG	GCCTGGGGGT	GTGCTGGCCC	GGCTCCTGCT	CCCCGCCCTG
02201	CTGGTGCCCT	GGGGGAGGCC	TGGCCCAAGC	AGGGGCCACT	CTGGGAAGGA
02251	GTCCCCGCTC	CCTGGCCAGT	CCTGCCCGAG	CGGAGGGGCC	CCAGCCCACC
02301	CACCCCTCTC	CTCCCTTTC	CTCTGGCCAG	GCCCTTCCA	GTCGGGAGGA
02351	TTCCAGCTCA	GCTCCAGCGG	CTTCTGCCC	CGTCCTCCGC	CCCTTTCCTG
02401	CTGTGCTTCC	CTGGGGAAGC	CCCAGCTTCC	GTCCATCGGG	AGACGGCCCA
02451	GCAGCCCTGG	AGTAGGGGGA	GGCAGGGGGC	AGGGAGGGCC	CCCAGCATGA
02501	CCTTAGCAG	CTGGTCTCAG	ACCTTGGGCG	CCAAAGCCGG	AGGCAGGAGG
02551	GGCGGTGCTC	TCGCAGCTTA	GGGTGAGGAG	GCCAAATATG	GACAGCCAGC
02601	GCCCTGCCCT	GTCCCCTGGG	GGGCCACAGG	GACTGGCCTC	TCCACCGGGG
02651	ATCTGGAGGC	TTGACGCTAC	TGCCATCAGC	CAGGCTGAGG	CTCTGCCAGC
02701	TCCTGTAGGG	CCCTCCTGGA	GGCTCTGGGG	CCGTGTGAAG	GGCAGGTGTG
02751	TGCGGCATGT	GTCAGGGAGG	GGCAAGTTTG	AGCTGGAAGC	CCGTCCAGGT
02801	TGCCTGGTCC	AAGCAGTGAC	CCAGGGTGAT	GAGGAGCAGA	TAGTGGGGGC
02851	GGCCACATGG	CTCCTGGGGG	GTGAAGGGGA	CCCAGATGCC	AAGGCTGCCT
02901	GGGACCTGGG	GGCAGCGGGG	GCTGAGCATG	GGGGCTGGGG	GCGCGGTGCT
02951	GACTACTGCC	TCCTGCCCCAG	CTGAGAAGGT	GAGCTCCCTG	GGCAAAGACT
03001	GGCACAGATT	CTGCCCTCAGG	TGCGAGCACT	GCAGCAAGAC	GCTGACCCCT
03051	GGGGGCCATG	CCGAGGTAAG	CGCCTCCCC	AGGCAGGGAG	GGGGCGGGGA
03101	GCCGGGCCAG	ACCCCCGCCC	TCAACCCCTG	CCCTCTGCCT	AGCATGATGG
03151	AAAGCCCTTC	TGCCACAAGC	CCTGCTATGC	CACGCTGTTT	GGACCCAAAG
03201	GTGAGACTGG	GTCCCCCATG	GGCCAGGCCG	GTGGGGACAC	CCCGCCCAGC
03251	TCAGACGGCC	CAGGTCCCCT	TCTCCCCTTG	CCTGTGCGGT	CCCCTCCCTC
03301	CTGGAAGGAC	AAGCACTCTC	CCTGCCTTCC	CCACTGCGGC	CCTCTGGGGA
03351	TGCGGTCTCTG	GCCCCCATG	GCTGAAGGAG	CCTTCTGCGG	AAGTTGGGGG
03401	TGGCTGAGAG	GTGCGGGGGT	GGGGAGGGCC	CGGGCTCCCG	TGTCCAGTGC
03451	CTGCCCCCAC	CCAGGGGTGA	ACATCGGAGG	GGCCGGCTCC	TACATCTACG
03501	AGAAGCCCTC	TGCGGAGAAA	CCCCAGGTCA	CCGGCCCCAT	CGAGGTCCCG
03551	GTGGCCCGAA	CTGAGGAGCG	GAAAGCCAGC	GGCCCCCGA	AGGGGCCCCAG
03601	CAAAGGTGGG	CGGGGTGAGT	GTGTGGCTCG	GGGGTGGGGT	CGGCGCCGGC
03651	AGACCCTGAC	CCCGCCCTC	CCCCAGCCTC	CAGCGTCACC	ACGTTACCG
03701	GGGAGCCCAA	CATGTGTCTC	CGCTGCAACA	AGAGGGTCTA	CTTCGGTGAG

03751 TGGCTGCGCC CGGCCCTGCT CTGGGAGGGC TCCCCGGGCG CCCC GGCGTC
03801 ATCCTCTGTC CCCTCCCCAG CCGAGAAGGT GACGTCTCTG GGCAAGGACT
03851 GGCACCGGCC GTGCCCTGCGC TGCAGGCGCT GTGGGAAGAC GCTGACCCCG
03901 GGCAGGACAG CGGAGGTGAG AGGCGAGCGG CCCC GGACCG CGAGGGGGGC
03951 CGGCGCGGGG GGCAGGCGGC GGGCCCGAGG AGGGCTATGA GGGTCCGGGG
04001 ACGCGAGGGC CCGAGGAGGG TGGGCGGGGG TTCCGGGGTG GAGCGGGCGG
04051 GCCCCGAGGG GAGCTTCAGG CCGGGACGGG CGGGCGGGGG CTGCGGTCTG
04101 GGGTGGGCAG GCGGGCCCCG AGGGGAGCTG CCGGTCTGGG GTGGGCAGGC
04151 GGGCCCCGAG GGGAGCTGCG GGCCGGGAGG GGCAGGCGCG GCTGCCCCCT
04201 GGAGGCCCGC CTGGCGCGGT GCGCGCACCG CGCACGGACG CTGGTGCGGC
04251 GGCAGGCGCT CCGCTGGTGA GGCAGGCGCG CTGCGTCCTC CAAGTCCACC
04301 TGGGGAACCG AGGGCTCAGG GTGCCGGGCG CCTGGACGTG GAGGAGGCCA
04351 CCGGGGGCGG TGGGCGTGGA GTCTGTGGTC CCCTTCTCAC CACCCGCACC
04401 CTGTCTTAG CACGATGGCC AGCCCTACTG CCACAAGCCC TGCTACGGAA
04451 TACTCTTCGG ACCCAAGGGT GAGTGTGCGC TGGAGTGTGG GCCGCGGGCC
04501 CCCTCCCGCC CTCTCCTCCA CCAAGCGGTC TCTCTCTGCA GGAGTGAACA
04551 CGGGAGCCGT GGGCAGCTAC ATCTATGACA AGGACCCTGA AGGCAAAGCT
04601 CAGCCCTAGG CCCCCGGGCC GCTCTGTGCG GGTCCCTGAC CCCAGGCCCA
04651 CTGCTTGCT GCGCGGGGAG AGTGCCCGCT GCCAGGCCG CCTCTGCACC
04701 TGCAAGTCCA GGGCCAGAGA GCTGGGGGAG GGCCCTAACC CCAGGACCCT
04751 GCCCCGTCCC TGTCTCCGGG TGTATCTGCC TGTGTGTCCC CGACGGCCCG
04801 CTGCCCCCTT TCGTCCTGGC CCCACGTGTC CCCACGTGCG GGTCTCGTGG
04851 CCCACATGC CCCTGGTGTG TCTGTGGCCT GGGTGACCTT TCTGAGGTGG
04901 AGCCGCCCCC ATCCCGCCCA CAGTGTATT TATGCCCCAC TTGCCAGTGA
04951 CAGCCACAGC CACGCCCTC ACCGTGTTCC TCCCGCCTGC CGCGCCAGCG
05001 CCCGCCACC GCCCTCACGT GGCTCACACT CTGAGTGCTG GGACTTTTGC
05051 TACCAATAAA AGGTCTGAAG GTCAAG

>PLD4_cDNA_1894 bp

00001 TCAGCGTGTC TGAGACTTTC TGCAGAGAAC AAGTCTAATG GAGCAGCAGA
00051 CTGGCTCACC CGGCTCCAGA TGTCTGTCAA GGGCGCAGAG GGAAGTACGG
00101 AGGATGAAGA GGAAGTGGCC AGAAGGGGAA GCAGCAGGCT GCAGAGAGGA
00151 GGCAGGTGGG AGGTGATCGC GGTAACGGCC TGCAAGCTGA CGGCTGCGT
00201 CTGTGGCGAA GCCAAGATGA ACGCCAAGGC GGGACCCTTG GAGGTGCGGG
00251 GGATGCTCGT GCTGCTGTGC CTGGGCGCCG TGACCCTCAC CTGCCCTCTG
00301 GGGCTGGGGT CCTCCCCTTC CGCCTGGAGC CAGGGCTGCC CTGAGGAAGG
00351 GCCCGCCAGG CCTGGGGGCC TTGGCTCCCG TGTGGACTGG GATCCTCGAG
00401 GACGGGAGGC CCGGAGGCGG CATCAGCGAA AGGACTCCTG CCGGCTCGTC
00451 CTCGTGGAGA GCATCCCCCA GGACCTGCGA TCTGTAGCAG GCAGCCCGGC
00501 CGCCAGCCC CTGGCCCAGG CCTGGATGCA GCTACTGGAC GCCGCCCGAG
00551 AGAGCGTCCA CGTGGCCTCC TTCTACTGGT CCCTCACGGG GCCCGACATC
00601 GGGGTCAACG ACTCGTCTTC CCAGCCGGGC GAGGCCCTCC TGCAAAGCT
00651 GCAGCAGCTG CTGGACAGAA ACGTGTCCCT GGCCGTGGCC ACCAGACCC
00701 CAACTCCGGC CAAGAACTCC ACTGACCTGC AGGTCTGGA AAGCCGAGGT
00751 GCCCAGGTGA GACACGTGCC CATGGGAAAG CTCACTGGCG GCGTTTTGCA
00801 CTCCAAGTTC TGGGTGGTGG ATGGGCGGCA CATCTACGTG GGCAGTGCCA
00851 ACATGGACTG GCGGTCCCTG ACACAGGTGA AGGAGCTCGG TGCTGTCATC
00901 TACAAGTGA GCCGCCTGGC CCAGGACCTG GAGAAGACCT TCCAGACCTA
00951 CTGGGTGCTG GGGACACCCA GGGCTGTCTT CCCCAGCGC TGGCTCAGA
01001 ACTTCTCCTC TCACATCAAC CGCTTCCAGC CACTCCGGGA TCACTTTGAC
01051 GGGGTGCCCA CCACGGTCTA CTTCTCGGCG TCACCGCCCT CTCTCTGCCC
01101 CCACGGCCGC ACCCGCGACC TGGATGCGCT GCTAGCGGTC ATGGGGGCTG
01151 CCCGGGAGTT CCTCTACGCC TCGGTGATGG AGTACTTCCC CACCACACGC
01201 TTCAGACACC CCGCCAGCTA CTGGCCAGTG CTGGACACGG CGCTGCGGGT
01251 GGCAGCCCTC AGCAGGGGGG TGCAGCGTGC CCTGCTGGTC AGCTGCTGGC

```

01301 TCAACACGGA CCCCAGGATG TTCCCCTTCC TGCGGTCCCT GCAGGCACTC
01351 AGCAACCCAG CGGCCAACGT GTCCATGGAC GTGAAAGTCT TCATCGTGCC
01401 CGTGGGGAAC CACTCCAACA TCCCCTTCAG CAGGGTGAAC CACAGCAAGT
01451 TCATGGTCAC GGAGAAGGCG GCCTACATAG GCACGTCCAA CTGGTCAGAA
01501 GATTACTTCA GCAGCACCTC AGGTGTGGGC CTGGTGGTCA GCCAGAGGGC
01551 CTCTGGCGCC CAGCCGGGGG TGAGCACCGT GCAGGAGCAG CTGCGGCAGC
01601 TCTTCGAGCG AGACTGGAGC TCCCGCTACG CCGTGGGCCT GGATGGACAG
01651 GCCCAGGGCC AGGACTGTGT TTGGCAGGGC TGAGGTTCGG CCCTTCCTGG
01701 CAGCGGGGTC CTGGCAGCGG GGTGGGGCCT CCTTGCCTTG CCTGGCCCCC
01751 AGCCTGGACT CCAAGCAGCT TCACTCGCAC AAGCCCTGGT CAGGGGCGGG
01801 ACTGTCCACT TCAGGGCGGA CACAAACCAC TTGCTCTCCA AATCTAGCCC
01851 CTTTGAACCC CCCGCCTGCT CCAGGGAGCT GTCCGGGATG CCCC

```

>FERMT3_cDNA_2522 bp

```

00001 GAAACTCCAA AGAGAAAGCA GAGGGGGAGG AAGCACGCAG CGGTCTGCAG
00051 GTGTGTGGGC CGTGGCCAGG AGTGGCTGAC GCGCCGACCC CCCC AACACA
00101 CCTGCAGCCC CAGCCCCTCG CAGGCAAGCG CCGCCGCAGC CATGGCGGGC
00151 ATGAAGACAG CCACCGGGGA CTACATCGAC TCGTCCTGGG AGCTGCGGGT
00201 GTTTATAGGA GAGGAGGACC CGGAGGCCGA GTCGCTCACC CTCCGCGTCA
00251 CGGGGGAGTC ACACATCGGT GGGGTGCTCC TGAAGATTGT GGAGGAGATC
00301 AAACGCAAGC AGGACTGGTC AGACCACGCC ATTTGGTGGG AACAGAAAAG
00351 GCAGTGGCTG CTGCAGACCC ACTGGACGCT GGACAAATAC GGGATCCTGG
00401 CCGACGCCCG CCTCTTCTTC GGGCCCCAGC ACCGGCCCGT CATCCTGCGG
00451 CTGCCCAACC GCCGTGCCCT GCGCCTCCGC GCCAGCTTCT CCCAGCCCCT
00501 CTTCCAGGCC ATGGTGGCCA TCTGCCGGCT CCTCAGTATC CGGCACCCTG
00551 AGGAGATGTC TCTGCTCCGG GCTCCCGAGA AGGAGAAGAA GAAGAAGAAA
00601 GAAAAGGAGC CGGAGGAGGA GGTGTATGAC CTGACCAAGG TCGTCCTGGT
00651 CGGGGGCGTG GCCCCCGCGT CGTTCCGGGG GATGCCAGCC CACTTCTCAG
00701 ACAGTGCCCA GACGGAGGCC TGCTACCACA TGCTGAGCCG GCCGCAGCCC
00751 CCGCCGGACC CCCTCCTGCT GCAGCGCCTG CCTCGGCCCA GCTCCCTCTT
00801 GGACAAGACC CAGCTCCACA GCAGGTGGCT GGATTCATCG CGGTGCCTCA
00851 TGCAGCAGGG CATCAAGGCC GGGGACACGC TCTGGCTGCG CTTCAAGTAC
00901 TACAGCTTCT TCGACCTGGA TCCCAAGACA GACCCAGTGC GGCTGACCCA
00951 GTTGTATGAG CAGGCTCGGT GGGACCTGCT GCTGGAAGAG ATTGACTGCA
01001 CCGAGGAGGA GATGATGGTG TTTGCAGCCC TACAGTACCA CATCAACAAG
01051 CTGTCCAGGA GCGGGGAGGT GGACGAACCA GCGGGCACAG ACTCAGGGCT
01101 GGACGACCTG GATTTAGCCC TGAGCAACCT GGAGGTGAAG CTGGAGGGGT
01151 CGGCGCCAC GGACATGCTG GACAGCCTCA CCACCATCCC AGAACTCAAG
01201 GACCATCTCC GGATCTTCCG GCCCCGAAA CTGACTCTGA AGGGGTACCG
01251 CCAGCACTGG GTGGTGTTC AAGGAGACCAC CCTGTCCTAC TACAAGAGCC
01301 AGGACGAGGC CCCC GGGGAA CCCATCCAGC AGCTCAACCT CAAGGGCTGT
01351 GAAGTGGTCC CTGATGTCAA CGTCTCAGGC CAGAAGTTCT GCATCAAACCT
01401 CCTGGTGCCC TCCCCTGAGG GCATGAGTGA GATCTACCTG CCGTGCCAGG
01451 ATGAGCAGCA GTATGCCCCG TGGATGGCTG GCTGCCGACT GGCCTCCAAG
01501 GGCCGCACCA TGGCGGACAG CAGCTACTCC AGCGAGGTCC AGGCCATCCT
01551 GGCCTTCCTC AGCCTACAGC GGACAGGCGG CCGTGGCGGG GGCTCCGGCA
01601 ACCATCCCCA GGGTCCCGAT GCCTCCGCCG AGGGCCTCAA CCCTTATGGC
01651 CTTGTGGCCC CACGCTTCCA GAGAAAGTTC AAGGCCAAGC AGCTCACTCC
01701 ACGGATCCTG GAAGCCCACC AGAACGTGGC CCAACTCTCG CTGTCTGAGG
01751 CCCAGCTGCG TTTTATCCAG GCCTGGCAGT CCCTCCCCGA CTTGCGCATC
01801 TCTTATGTTG TGGTCAGGTT CAAGGGCAGC AGGAAAGACG AGATCCTGGG
01851 CATCGCCAAC AACCGACTGA TCCGCATCGA CTTGTCTGTG GGTGACGTGG
01901 TTAAGACCTG GCGCTTCAGC AACATGCGCC AGTGGAACGT CAACTGGGAC
01951 ATCCGGCAGG TGGCCATCGA GTTTGACGAG CACATCAACG TGGCTTTTAG
02001 CTGCGTGTCC GCCAGCTGCC GCATTGTGCA TGAGTACATC GGGGGCTACA

```

02051 TCTTCCTGTC CACTCGGGAG AGGGCCCGGG GGGAGGAGCT GGACGAGGAC
02101 CTCTTCCTGC AGCTCACCGG AGGCCACGAG GCCTTCTGAA GCCTGTCTCA
02151 CTGCCCCTGC CCGCTACCA CCTGCCATGA CCACTCCTAA GTCCACACCC
02201 GCTGGGACTC ACCGTCCACA CACTGTCCAG ACATGCAACG ACCGAGCTGG
02251 ACCCATTCAC TCACTGTAC TGGCTCTGTG TAGACCAGGG TCCTGGCTGG
02301 GTCAGACCCT GCCATCCTCC GGGAGGGTAG GCCCTCATTT GCACAGCACC
02351 CGCCCTTCCC TTGTCTGAGT GGCCAGGACC AACACCTCTG ACCCAGCTGA
02401 AGTCCCTGAG CACACGAGGA AGACTGGCTG CAGCCACGGG ATGATGACTC
02451 GTAGTTTCAA ATCAGTTTCT TTTTATCTT TTTACATTTT TAAAAAATA
02501 AATATTTTAT TGTGGGTCA TC