

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Tierzucht

**Identifizierung und genomische Charakterisierung von  
Kandidatengeneten für Stoffwechsel- und  
Gesundheitsmerkmale des Milchrindes**

Christine Maria Wurmser

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. H. Luksch

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H.-R. Fries

2. Priv.-Doz. Dr. C. Kühn  
(Universität Rostock)

Die Dissertation wurde am 27.05.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 04.09.2013 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1 Leistungsantagonismen bei Milchkühen . . . . .	3
2.2 Aspekte der Tiergesundheit und Nutzungsdauer . . . . .	4
2.2.1 Stoffwechselsituation in der frühen Laktation . . . . .	4
2.2.1.1 Parameter zur Bestimmung der negativen Energiebilanz	4
2.2.1.2 Genetische Architektur des Merkmals Milchfettgehalt	5
2.2.1.3 Synthesewege des Milchfetts . . . . .	5
2.2.2 Bedeutung von Vitamin-D <sub>3</sub> für die Gesundheit von Milchkühen	7
2.3 Genomweite Assoziationsstudien bei komplexen, quantitativen Merkmalen und ihre Anwendung in der genomischen Selektion . . . . .	9
<b>3 Tiere, Material und Methoden</b>	<b>11</b>
3.1 Tiere und Phänotypen . . . . .	11
3.1.1 Holstein-Friesian- und Fleckvieh-Bullen der genomweiten Assoziationsstudien . . . . .	11
3.1.2 Tierpanel für die Resequenzierung von Kandidatengenem . . . . .	12
3.1.3 Fleckvieh-Tiere der Next-Generation-Sequenzierung . . . . .	12
3.2 DNA-Extraktion aus Sperma . . . . .	12
3.3 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der DNA-Proben . . . . .	13
3.4 PCR . . . . .	14
3.4.1 Primerdesign . . . . .	14
3.4.2 Standard-PCR . . . . .	14
3.4.3 PCR-Optimierung . . . . .	15
3.5 Sanger-Sequenzierung . . . . .	15
3.5.1 Aufreinigung der PCR . . . . .	15
3.5.2 Sequenzierreaktion, Aufreinigung und Kapillargelelektrophorese	15
3.5.3 Analyse der Sequenzen auf Polymorphismen . . . . .	16
3.6 Genotypisierung und Imputation . . . . .	16
3.6.1 Genotypisierung mit der <i>TaqMan</i> -Methode . . . . .	16
3.6.2 Genomweite Genotypisierung und Qualitätskontrolle . . . . .	17
3.6.3 Imputation . . . . .	18

3.7	<i>In-silico</i> -Analysen . . . . .	18
3.7.1	Auswahl und Annotation der Kandidatengene . . . . .	18
3.7.2	Genomische Charakterisierung der Kandidatengene . . . . .	19
3.7.3	Analyse des Kopplungsungleichgewichts . . . . .	20
3.7.4	Analyse der Polymorphismen aus der Next-Generation-Sequenzierung . . . . .	21
3.7.5	Deskriptive Statistik . . . . .	21
3.7.6	Genomweite Assoziationsstudien . . . . .	22
3.7.7	Bestimmung des chromosomalen Anteils an der Zuchtwert-Varianz	23
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
4.1	Stoffwechselstatus in der frühen Laktation . . . . .	25
4.1.1	Genomweite Assoziationsstudien bei Holstein-Friesian . . . . .	25
4.1.1.1	Fettgehalt-Zuchtwert . . . . .	25
4.1.1.2	Fettgehalt-Zuchtwert der Laktationstage 10 bis 20 . . . . .	28
4.1.1.3	Fett-Protein-Verhältnis der Laktationstage 10 bis 20 . . . . .	31
4.1.1.4	Vergleich der GWAS der Merkmale FPro-ZW, FPro10-20 und FPR10-20 . . . . .	31
4.1.2	Genomweite Assoziationsstudien bei Fleckvieh . . . . .	33
4.1.2.1	Fettgehalt-Zuchtwert . . . . .	33
4.1.2.2	Fettgehalt-Zuchtwert der Laktationsphasen . . . . .	35
4.1.3	Vergleich der GWAS der Rassen Holstein-Friesian und Fleckvieh . . . . .	42
4.1.4	Funktionale und genomische Charakterisierung der Kandidatengene . . . . .	43
4.1.4.1	QTL auf BTA5 und die Kandidatengene <i>EPS8</i> und <i>MGST1</i> . . . . .	43
4.1.4.2	QTL auf BTA6 und die Kandidatengene des <i>CSN</i> -Clusters . . . . .	45
4.1.4.3	QTL auf BTA11 und das Kandidatengen <i>PAEP</i> . . . . .	46
4.1.4.4	QTL auf BTA14 und das Kandidatengen <i>DGAT1</i> . . . . .	48
4.1.4.5	QTL auf BTA14 und das Kandidatengen <i>GPIHBP1</i> . . . . .	51
4.1.4.6	QTL auf BTA19 und das Kandidatengen <i>FASN</i> . . . . .	55
4.1.4.7	QTL auf BTA20 und das Kandidatengen <i>GHR</i> . . . . .	59
4.1.4.8	QTL auf BTA27 und das Kandidatengen <i>GPAT4</i> . . . . .	61
4.2	Gesundheitsmerkmale und Nutzungsdauer . . . . .	66
4.2.1	Genomweite Assoziationsstudien . . . . .	66
4.2.1.1	Assoziation auf BTA6 mit den Merkmalen Nutzungsdauer und Body-Condition-Score bei Holstein-Friesian . . . . .	66
4.2.1.2	Assoziation auf BTA6 mit Gesundheits- und Leistungsmerkmalen bei Fleckvieh . . . . .	68
4.2.2	Korrelation der untersuchten Merkmale . . . . .	70
4.2.3	Funktionale und genomische Charakterisierung des <i>GC</i> -Gens . . . . .	70
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
5.1	Allgemeiner Versuchsansatz . . . . .	77
5.2	Stoffwechselforgänge in der frühen Laktation . . . . .	78

5.3	Verwendung des Merkmals Fettgehalt als Parameter für den Stoffwechsell-zustand . . . . .	80
5.4	Vergleich der signifikant assoziierten QTL mit den Ergebnissen anderer Assoziationsstudien für das Merkmal Fettgehalt . . . . .	82
5.5	Genetische Architektur des Merkmals Fettgehalt . . . . .	83
5.6	Kausalität der Polymorphismen in <i>GPAT4</i> und <i>GPIHBP1</i> . . . . .	84
5.7	Zusammenhänge zwischen Vitamin-D <sub>3</sub> und Gesundheitsmerkmalen beim Rind . . . . .	85
5.8	Assoziation zwischen dem Merkmal Milchmenge und dem QTL auf BTA6	87
5.9	Kausalität der identifizierten Varianten im <i>GC</i> -Gen . . . . .	88
5.10	Verwendung von Zuchtwerten als indirekte Phänotypen . . . . .	89
5.11	Auswirkungen der LD-Struktur auf die Identifizierung von Kandidatenge-nen . . . . .	90
5.12	BTA6 als Beispiel für die Assembly-Problematik beim Rind . . . . .	91
5.13	Problematik der Verifizierung der Kausalität identifizierter Varianten .	91
5.14	Validierung der Ergebnisse aus GWAS über den Vergleich zweier Rinder-Populationen . . . . .	92
5.15	GWAS im Zeitalter der genomischen Selektion . . . . .	94
5.16	Genomweite Assoziationsstudien bei komplexen Merkmalen und die Im-plementierung von NGS . . . . .	95
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>123</b>

## Abbildungsverzeichnis

2.1	Genetische Architektur des Merkmals Fettgehalt . . . . .	5
2.2	Fettsynthesewege im Eutergewebe . . . . .	7
4.1	Manhattan-Plot für das Merkmal Fettgehalt-Zuchtwert bei Holstein-Friesian . . . . .	26
4.2	Aufteilung der additiv-genetischen Varianz des Merkmals Fettgehalt-Zuchtwert auf die Chromosomen bei Holstein-Friesian . . . . .	28
4.3	Manhattan-Plot für das Merkmal Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20 bei Holstein-Friesian . . . . .	29
4.4	Aufteilung der additiv-genetischen Varianz des Merkmals Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20 auf die Chromosomen bei Holstein-Friesian . . . . .	31
4.5	Manhattan-Plot für das Merkmal Fett-Protein-Verhältnis der Laktationstage 10 bis 20 bei Holstein-Friesian . . . . .	32
4.6	Manhattan-Plot für das Merkmal Fettgehalt-Zuchtwert bei Fleckvieh . . . . .	34
4.7	Aufteilung der additiv-genetischen Varianz des Merkmals Fettgehalt-Zuchtwert auf die Chromosomen bei Fleckvieh . . . . .	36
4.8	Manhattan-Plot für das Merkmal Fettgehalt der Laktationstage 20, 50 und 200 bei Fleckvieh . . . . .	37
4.9	Erklärte Zuchtwert-Varianz der Chromosomen für das Merkmal Fettgehalt über den Laktationsverlauf bei Fleckvieh . . . . .	41
4.10	Aufteilung der erklärten additiv-genetischen Varianz der Merkmale FPro20 und FPro200 auf die Chromosomen bei Fleckvieh . . . . .	42
4.11	Positionelle Kandidatengene auf BTA5 . . . . .	44
4.12	Positionelle Kandidatengene auf BTA6 . . . . .	45
4.13	Positionelle Kandidatengene auf BTA11 . . . . .	46
4.14	Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des <i>PAEP</i> -Gens . . . . .	48
4.15	Positionelle Kandidatengene auf BTA14 . . . . .	49
4.16	Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des <i>DGAT1</i> -Gens . . . . .	50
4.17	LD-Plot für den auf BTA14 assoziierten QTL nach Korrektur auf die <i>DGAT1</i> -Variante . . . . .	51
4.18	Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des resequenzierten <i>GPIHBP1</i> -Gens . . . . .	53
4.19	Transkriptionsfaktorbindestelle für CREB an SNP TUM-4128 . . . . .	55
4.20	Positionelle Kandidatengene auf BTA19 . . . . .	55
4.21	Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des <i>FASN</i> -Gens . . . . .	58
4.22	Positionelle Kandidatengene auf BTA20 . . . . .	59
4.23	Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des <i>GHR</i> -Gens . . . . .	61
4.24	LD-Plot für den auf BTA27 assoziierten QTL . . . . .	62

4.25	Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des <i>GPAT4</i> -Gens bei Holstein-Friesian . . . . .	64
4.26	Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des <i>GPAT4</i> -Gens bei Fleckvieh . . . . .	64
4.27	Transkriptionsfaktorbindestellen an SNP TUM-3974 des <i>GPAT4</i> -Gens	65
4.28	Manhattan-Plot und LD-Plot für die Merkmale RZN und BCS bei Holstein-Friesian . . . . .	67
4.29	Manhattan-Plots und LD-Plots des identifizierten QTL auf BTA6 für die Merkmale Persistenz, Fitness, Milchmenge und Bemuskelung bei Fleckvieh	69
4.30	Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des <i>GC</i> -Gens bei Holstein-Friesian . . . . .	73
4.31	Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des <i>GC</i> -Gens bei Fleckvieh . . . . .	74
4.32	Transkriptionsfaktorbindestelle für C/EBP an SNP TUM-4005 des <i>GC</i> -Gens . . . . .	76
5.1	Publizierte QTL auf BTA6 für das Merkmal Milchmenge . . . . .	88
9.1	Verwandtschaftsstrukturen der Holstein-Friesian- und Fleckvieh-Bullen	123
9.2	Verteilung der Phänotypen der Gesundheitsmerkmale in den Versuchspopulationen . . . . .	124
9.3	Verteilung der Phänotypen der Fett-Merkmale in den Versuchspopulationen . . . . .	125

## Tabellenverzeichnis

3.1	Phänotypen der Holstein-Friesian- und Fleckvieh-Bullen . . . . .	12
3.2	Primer- und Sondensequenzen der <i>TaqMan</i> -Assays . . . . .	17
4.1	Signifikante SNP der QTL für das Merkmal Fettgehalt-Zuchtwert bei Holstein-Friesian . . . . .	28
4.2	Signifikante SNP der QTL für das Merkmal Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20 bei Holstein-Friesian . . . . .	30
4.3	Signifikante SNP der QTL für das Merkmal Fett-Protein-Verhältnis Laktationstage 10 bis 20 bei Holstein-Friesian . . . . .	32
4.4	Signifikante SNP der QTL für das Merkmal Fettgehalt-Zuchtwert bei Fleckvieh . . . . .	35
4.5	Signifikante SNP der QTL der einzelnen Laktationstage bei Fleckvieh . . . . .	40
4.6	SNP des <i>FASN</i> -Gens mit dem stärksten LD zum Topmarker. . . . .	57
4.7	Vergleich der P-Werte der SNP TUM-3974 und TUM-3994 mit Topmarken der GWAS . . . . .	66
4.8	Auflistung der signifikantesten Marker auf BTA6 für die Merkmale Nutzungsdauer, Persistenz, Fitness, Bemuskelung und Milchmenge bei den Rassen HF und FV . . . . .	68
4.9	Korrelation der Merkmale bei Fleckvieh . . . . .	70
4.10	LD zwischen den mittels NGS identifizierten SNP und den signifikantesten Markern aus der GWAS bei Fleckvieh . . . . .	75
4.11	Vergleich der P-Werte des SNP TUM-4005 und der Topmarker aus der GWAS . . . . .	76
9.1	Tierpanel für die Resequenzierung von <i>GPAT4</i> in Holstein-Friesian . . . . .	126
9.2	Tierpanel für die Resequenzierung von <i>GPIHBP1</i> in Holstein-Friesian . . . . .	126
9.3	Tierpanel für die Resequenzierung von <i>GC</i> in Holstein-Friesian . . . . .	127
9.4	Fleckvieh-Gründertiere der Next-Generation-Sequenzierung . . . . .	128
9.5	Primerübersicht . . . . .	129
9.5	Primerübersicht . . . . .	130
9.6	Genstruktur der annotierten Kandidatengene <i>GPAT4</i> , <i>GPIHBP1</i> und <i>GC</i> . . . . .	131
9.7	Anteil der erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal FPro-ZW bei Holstein-Friesian . . . . .	132
9.8	Anteil der erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal FPro10-20 bei Holstein-Friesian . . . . .	133
9.9	Anteil der erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal FPro-ZW bei Fleckvieh . . . . .	134
9.10	Anteil der erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal FPro20 bei FV . . . . .	135

9.11 Anteil der erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal FPro200 bei FV . . . . .	136
9.12 SNP des <i>PAEP</i> -Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere . . . . .	137
9.13 SNP des <i>DGAT1</i> -Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere . . . . .	140
9.14 SNP des <i>GPIHBP1</i> -Gens aus der Resequenzierung des HF-Tierpanels . .	141
9.15 SNP des <i>FASN</i> -Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere . . . . .	142
9.16 SNP des <i>GHR</i> -Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere . . . . .	143
9.17 SNP des <i>GPAT4</i> -Gens aus der Resequenzierung des HF-Tierpanels und aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere . . . . .	144
9.18 SNP des <i>GC</i> -Gens aus der Resequenzierung des HF-Tierpanels und aus der NGS der FV-Gründertiere . . . . .	145

## Abkürzungen

<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	Calcitriol, 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D <sub>3</sub>
<b>25(OH)D<sub>3</sub></b>	Calcidiol, 25-Hydroxy-Vitamin-D <sub>3</sub>
<b>A</b>	Adenin
<b>ACSL</b>	Acyl-CoA-Synthetase
<b>AGPAT</b>	Acylglycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
<b>BCS</b>	Body-Condition-Score
<b>BLUP</b>	Best-Linear-Unbiased-Prediction
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BTA</b>	<i>Bos taurus</i> Autosom
<b>BTX</b>	<i>Bos taurus</i> X-Chromosom
<b>C</b>	Cytosin
<b>C/EBP</b>	CCAAT/Enhancer-bindendes Protein
<b>CREB</b>	cAMP-Response-Element-binding
<b>CSN</b>	Casein kodierendes Gen
<b>CSN1S1</b>	α-S1-Casein kodierendes Gen
<b>CSN1S2</b>	α-S2-Casein kodierendes Gen
<b>CSN2</b>	β-Casein kodierendes Gen
<b>CSN3</b>	κ-Casein kodierendes Gen
<b>DGAT</b>	Diacylglycerol-O-Transferase
<b>DGAT1</b>	Diacylglycerol-O-Transferase-1 kodierendes Gen
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EB</b>	Energiebilanz
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGFR</b>	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<b>EPS8</b>	Epidermal-Growth-Factor-Receptor-Pathway-Substrat-8 kodierendes Gen
<b>EPS8</b>	Epidermal-Growth-Factor-Receptor-Pathway-Substrat-8
<b>ESE</b>	Exon-Splice-Enhancer
<b>ESS</b>	Exon-Splice-Silencer
<b>EST</b>	Expressed-Sequence-Tag
<b>FAS</b>	Fettsäure-Synthase
<b>FASN</b>	Fettsäure-Synthase kodierendes Gen
<b>FFA</b>	freie Fettsäuren
<b>FPR</b>	Fett-Protein-Verhältnis, Fat-Protein-Ratio
<b>FPR10-20</b>	Fett-Protein-Verhältnis der Laktationstage 10 bis 20
<b>FPro-ZW</b>	Fettgehalt-Zuchtwert
<b>FPro</b>	Fettgehalt

<b>FPro10-20</b>	Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20
<b>FV</b>	Fleckvieh
<b>G</b>	Guanin
<b>G3P</b>	Glycerol-3-Phosphat
<b>GC</b>	Gruppen-spezifische Komponente kodierendes Gen
<b>GH</b>	Wachstumshormon, Growth-Hormone
<b>GHR</b>	Wachstumshormon-Rezeptor kodierendes Gen
<b>GHR</b>	Wachstumshormon-Rezeptor
<b>GK</b>	Glycerol-Kinase
<b>GPAT</b>	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase
<b>GPAT4</b>	Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase-4 kodierendes Gen
<b>GPIHBP1</b>	Glycosylphosphatidylinositol-anchored-high-density-Lipoprotein-bindende-Protein-1 kodierendes Gen
<b>GPIHBP1</b>	Glycosylphosphatidylinositol-anchored-high-density-Lipoprotein-bindende-Protein-1
<b>GRM</b>	genomische Verwandtschaftsmatrix
<b>GWAS</b>	genomweite Assoziationsstudie
<b>h<sup>2</sup></b>	Heritabilität
<b>HF</b>	Holstein-Friesian
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>LC</b>	langkettig
<b>LD</b>	Linkage Disequilibrium
<b>LfL</b>	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
<b>LPA</b>	Lysophosphatsäure
<b>LPL</b>	Lipoprotein-Lipase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MAF</b>	Minor-Allelfrequenz
<b>Mb</b>	Megabasen
<b>MC</b>	mittellangkettig
<b>MCFA</b>	mittellangkettige Fettsäuren
<b>MGST1</b>	mikrosomale Glutathione-S-Transferase-1 kodierendes Gen
<b>MGST1</b>	mikrosomale Glutathione-S-Transferase-1
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>mRNA</b>	messengerRNA
<b>NaCl</b>	Natrium-Chlorid
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NEB</b>	negative Energiebilanz
<b>NGS</b>	Next-Generation-Sequenzierung
<b>PAEP</b>	Progestagen-assoziiertes-endometrisches-Protein kodierendes Gen
<b>PAEP</b>	Progestagen-assoziiertes-endometrisches-Protein
<b>PAX5</b>	Paired-Box-Protein 5
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>pH</b>	Säuregrad
<b>Pro</b>	Proteingehalt

<b>QTL</b>	Quantitative-Trait-Locus
<b>QTN</b>	Quantitative-Trait-Nukleotid
<b>RZN</b>	Relativ-Zuchtwert-Nutzungsdauer
<b>SDS</b>	Sodium-Dodecyl-Sulfat
<b>SI</b>	Selektionsindex
<b>SNP-ID</b>	SNP-Identifikationsnummer
<b>SNP</b>	Single-Nukleotid-Polymorphismus
<b>SREBP</b>	Sterol-Regulatory-Element-Binding-Protein
<b>T</b>	Thymin
<b>TAG</b>	Triglycerid
<b>TBE</b>	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
<b>TBP</b>	TATA-bindende-Protein
<b>TFBS</b>	Transkriptionsfaktorbindestellen
<b>TGRL</b>	Triglycerid-reiche Lipoproteine
<b>U</b>	Unit
<b>UTR</b>	untranslatierter Bereich
<b>VDBP</b>	Vitamin-D-bindende Protein
<b>vit</b>	Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V.
<b>VLDL</b>	Very-Low-Density-Lipoprotein
<b>VNTR</b>	variable number of tandem repeats

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Quantitative Merkmale zeichnen sich dadurch aus, dass eine Vielzahl an Genen an der Ausprägung des Phänotyps involviert ist und diese jeweils nur geringe Merkmalseffekte aufweisen. Die Aufklärung der genetischen Grundlagen dieser komplexen Merkmale stellt daher eine große wissenschaftliche Herausforderung dar. Die Identifizierung merkmalsbestimmender Regionen erfolgt in der Regel über ein bestehendes Kopplungsungleichgewicht zwischen den assoziierten Markern und kausalen Varianten. Eine wichtige Voraussetzung für die Aufklärung der genetischen Grundlagen komplexer Merkmale ist deshalb die Analyse genomweit verteilter Polymorphismen. Die vollständige Sequenzierung und Assemblierung des Rindergenoms sowie die Entwicklung neuer molekulargenetischer Methoden ermöglichen seit wenigen Jahren die Durchführung genomweiter Assoziationsstudien (GWAS). Die erforderlichen hohen Markerdichten werden durch die Anwendung moderner Hochdurchsatz-Genotypisierungsmethoden erreicht und erlauben auch bei quantitativen Merkmalen eine erfolgreiche Identifizierung assoziierter Regionen (Quantitative-Trait-Loci, QTL). Die Ergebnisse aus GWAS tragen somit zur Aufklärung der genetischen Grundlagen komplexer Merkmale, wie z. B. Leistungs- und Gesundheitsparameter, beim Rind bei.

Die Stoffwechselproblematik von Milchkühen in der frühen Laktation kann als Merkmalskomplex mit ökonomischer und gesundheitlicher Relevanz angesehen werden. Mit der Steigerung der Milchleistung ging in den letzten Jahrzehnten eine Zunahme von Gesundheits- und Fruchtbarkeitsproblemen einher. Laktierende Kühe sind enormen metabolischen Belastungen ausgesetzt, die sich in vielen Fällen negativ auf die Gesundheit und die Nutzungsdauer auswirken. Bedingt durch das Auftreten der negativen Energiebilanz (NEB) in der frühen Laktation werden Körperfettreserven mobilisiert um das Energiedefizit auszugleichen. Die Freisetzung von Fettsäuren beeinflusst die Milchfettsynthese, so dass sich die Stoffwechselsituation im Fettgehalt der Milch widerspiegelt. Der tierindividuelle Umgang mit der Stoffwechselbelastung der frühen Laktation ist dabei möglicherweise auf unterschiedliche Varianten von Genen des Fettstoffwechsels zurückzuführen.

Einen weiteren und bislang weitestgehend unbeachteten Aspekt bei der Gesundheit von Milchkühen stellt die Vitamin-D<sub>3</sub>-Versorgung dar. In den letzten Jahren sind Gene des Vitamin-D<sub>3</sub>-Stoffwechsels in den Fokus humaner Studien geraten, da sie Assoziationen mit verschiedenen Erkrankungen zeigten. Beim Rind wurden bislang Zusammenhänge zwischen akutem Vitamin-D<sub>3</sub>-Mangel und dem Calcium-Haushalt in der frühen Laktation untersucht.

Aufgrund der vielschichtigen Auswirkungen von Vitamin-D<sub>3</sub> auf gesundheitliche Komponenten, wie z. B. das Immunsystem, kann eine Verbesserung der Vitamin-D-Versorgung beim Rind, ähnlich wie beim Menschen, durchaus als erstrebenswert erachtet werden. Da dem Vitamin-D<sub>3</sub>-Haushalt neben Umwelteinflüssen starke genetische Komponenten zugrunde liegen, ist eine züchterische Bearbeitung möglich.

Die Aufklärung der dem Umgang mit der metabolischen Belastung zugrunde liegenden Stoffwechselwege könnte für eine züchterische Verbesserung im Zuge der genomischen Selektion herangezogen werden. Über die Identifizierung assoziierter Marker sowie kausaler Varianten können Tiere selektiert werden, die positive Eigenschaften bezüglich der Stoffwechselstabilität und des Vitamin-D<sub>3</sub>-Haushalts tragen. Dies führt zu einer nachhaltigen Verbesserung der Gesundheit und des Wohlbefindens von Milchkühen sowie der Rentabilität der Milchviehhaltung.

Die spezifischen Ziele dieser Dissertation waren

- die Identifizierung von Kandidatengenen über genomweite Assoziationsstudien in Hinblick auf die Stoffwechselsituation in der frühen Laktation unter Verwendung der Parameter Milchfettgehalt und Fett-Protein-Verhältnis,
- die Aufklärung des kausalen Zusammenhangs von Gesundheitsmerkmalen mit dem für das Vitamin-D-bindende-Protein kodierenden *GC*-Gen und
- die systematische Suche nach Polymorphismen in den identifizierten Kandidatengenen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Leistungsantagonismen bei Milchkühen

Gesundheitliche Probleme in der frühen Laktation, Fruchtbarkeitsstörungen, eine kurze Nutzungsdauer und lange Zwischenkalbezeiten sind die Nebenerscheinungen der modernen Milchviehhaltung. Diese wirken sich negativ auf das Wohlbefinden der Tiere und auch auf die ökonomische Rentabilität der Milcherzeugung aus (RÖMER 2011). Die Nutzungsdauer von Kühen der Rasse Holstein-Friesian (HF) hat sich während der letzten Jahre zwar kontinuierlich erhöht, ein durchschnittliches Abgangsalter von 5,4 Jahren bei 2,5 Laktationen ist jedoch weiterhin zu niedrig (ADR 2012). In einer Studie zeigte RÖMER (2011), dass Lebensleistungen von 30.000 kg Milch in 3,5 Laktationen für eine rentable Milchproduktion erreicht werden müssten, aber 80 % der HF-Kühe bereits früher aus dem Produktionsprozess ausscheiden. Zu den Hauptabgangsursachen in der Milchviehhaltung zählen die sogenannten Produktionskrankheiten, wie Euter-, Klauen- und Stoffwechselerkrankungen sowie Fruchtbarkeitsstörungen.

Diese, mit einer hohen Milchleistung assoziierten Gesundheits- und Fruchtbarkeitsprobleme, gelten als Leistungsantagonismen und werfen die Frage auf, inwiefern die Leistungsgrenze der modernen Milchkühe bereits erreicht ist (STANGASSINGER 2007). Als Auslöser für die Gesundheitsproblematik werden die negative Energiebilanz in der frühen Laktation und der daraus resultierende metabolische Stress angesehen (COLLARD ET AL. 2000). Die begrenzte Verfügbarkeit der Energie ist dabei ursächlich für die Priorisierung der Milchleistung und die Einschränkung von Prozessen der Fruchtbarkeit und des Immunsystems (RAUW ET AL. 1998). Die NEB und die damit einhergehende Mobilisierung von Körpergewebe sind als evolutionäre Anpassung zur Sicherung des Überlebens und des Wachstums des Kalbes anzusehen (STANGASSINGER 2007). Der Energiemangel in der frühen Laktation führt aber nicht zwangsläufig zu gesundheitlichen Problemen. RÖMER (2011) konnte für die Rasse Holstein-Friesian zeigen, dass bei Kühen mit einer hohen Milchleistung Produktionskrankheiten nicht unweigerlich häufiger auftreten als bei Tieren mit einer geringen Leistung. Dieser tierindividuelle Umgang mit den metabolischen Belastungen der Laktation lässt vermuten, dass hierbei eine genetische Komponente zum Tragen kommt.

### 2.2 Aspekte der Tiergesundheit und Nutzungsdauer

#### 2.2.1 Stoffwechselsituation in der frühen Laktation

Milchkühe sind in der frühen Laktation starken metabolischen Belastungen ausgesetzt. Die einsetzende Milchproduktion zieht einen gesteigerten Energiebedarf mit sich, der durch die Futterraufnahme allein nicht ausreichend gedeckt werden kann. Die Kuh gerät in den Stoffwechsellzustand der negativen Energiebilanz. Um das Energiedefizit auszugleichen, werden körpereigene Reserven mobilisiert, die größtenteils durch den Abbau von Körperfett bereitgestellt werden (BELL 1995). Die resultierende Stoffwechselbelastung kann zu metabolischem Stress mit einhergehenden Einschränkungen physiologischer Prozesse im Körper führen. Begleiterscheinungen sind verminderte Fruchtbarkeit (BUTLER & SMITH 1989), durch eine Schwächung des Immunsystems bedingte Euter- und Klauenerkrankungen sowie Stoffwechselerkrankungen (COLLARD ET AL. 2000).

##### 2.2.1.1 Parameter zur Bestimmung der negativen Energiebilanz

Die Energiebilanz (EB) wird als aussagekräftigster Indikator für den Stoffwechsellzustand in der frühen Laktation angesehen (COFFEY ET AL. 2002), da sie direkt das Ausmaß des bestehenden Energiedefizits anzeigt. Die Bestimmung der EB ist jedoch aufwändig und an einer großen Tierzahl schwer durchführbar. Zur Erfassung und Beschreibung des Stoffwechsellstatus von Milchkühen werden daher indirekte Parameter wie der Body-Condition-Score (BCS) und diverse Metaboliten in Blut und Milch diskutiert (GILLUND ET AL. 2001; REIST ET AL. 2002; KLEIN ET AL. 2010). Das Verhältnis von Fettgehalt und Proteingehalt (Fat-Protein-Ratio, FPR) hat sich dabei als geeigneter Parameter für die Stoffwechsellsituation herausgestellt, da es die EB adäquat widerspiegelt (HEUER ET AL. 2000). Ein hoher FPR-Wert geht mit einer ausgeprägten NEB einher (BUTTCHEREIT ET AL. 2010). Studien zeigen zudem, dass es einen Zusammenhang zwischen dem FPR und der Inzidenz von Erkrankungen wie Mastitis, Klauenerkrankungen und Stoffwechselproblemen gibt (BUTTCHEREIT ET AL. 2012). Bei einer übermäßig starken Mobilisierung von Körperfett im Zuge der negativen Energiebilanz sind der Fettgehalt (DE VRIES & VEERKAMP 2000) und folglich auch das Fett-Protein-Verhältnis in der Milch erhöht. BUTTCHEREIT ET AL. (2011) schlagen daher das FPR als geeigneten Parameter für die Bestimmung der Energiebilanz in der frühen Laktation vor. Das FPR und der Fettgehalt in der Milch können mit einfachen Methoden bestimmt werden und sind Teil der routinemäßigen, monatlichen Milchleistungsprüfung.

### 2.2.1.2 Genetische Architektur des Merkmals Milchfettgehalt

Das Merkmal Milchfettgehalt wird in der Zuchtwertschätzung erfasst und ist wichtiger Bestandteil der züchterischen Beurteilung von Rindern. Mit geschätzten Heritabilitäten ( $h^2$ ) von 0,55 bis 0,68 liegt dem Merkmal eine starke genetische Komponente zugrunde (WADE & VLECK 1989; PANDER ET AL. 1992; STOOP ET AL. 2008). Durch die systematische Kartierung von QTL konnten bereits Regionen identifiziert werden, die einen Teil der genetischen Varianz erklären (BLOTT ET AL. 2003; COHEN-ZINDER ET AL. 2005; WEIKARD ET AL. 2005; ROY ET AL. 2006; VIITALA ET AL. 2006; SCHENNINK ET AL. 2009). Der Milchfettgehalt weist eine komplexe genetische Architektur auf, mit einer geringen Anzahl an bedeutenden QTL, die einen Großteil der genetischen Variation erklären und vielen QTL mit geringen Effekten (HAYES ET AL. 2010) (Abbildung 2.1). Bislang konnten hauptsächlich QTL mit vergleichsweise großen Merkmalseffekten, wie z. B. auf BTA14 (GRISART ET AL. 2004) und BTA20 (BLOTT ET AL. 2003) identifiziert und funktionell bestätigt werden. Der noch fehlende Anteil an der Gesamtvarianz deutet jedoch darauf hin, dass eine Vielzahl an QTL mit geringen Merkmalseffekten existiert, die bislang nicht aufgeklärt werden konnten (HAYES ET AL. 2010).

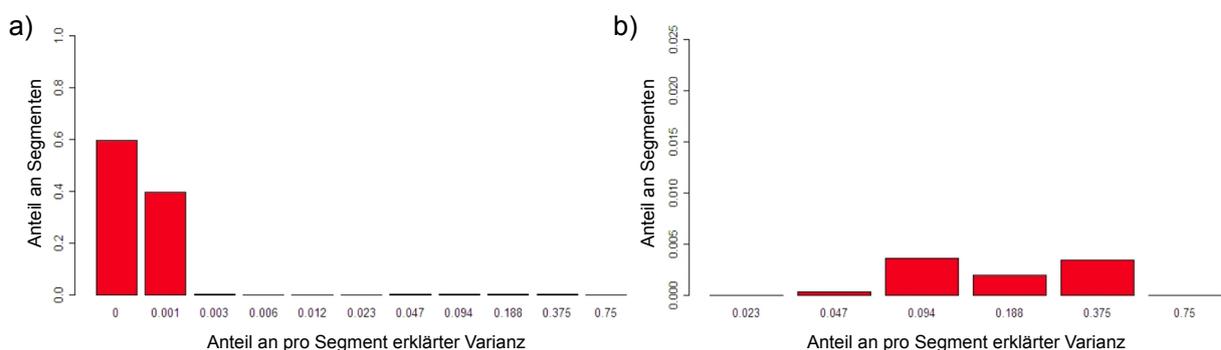


Abbildung 2.1: Genetische Architektur des Merkmals Fettgehalt bei australischen Holstein-Friesian. a) Verteilung der Anteile an pro Chromosomensegment erklärter Varianz. Ein Segment umfasst 50 Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) des Illumina BovineSNP 50K BeadChips. b) Extreme Werte aus Abbildung 2.1 a, mit Chromosomensegmenten die einen Anteil  $> 0,023$  der Varianz erklären. Verändert nach HAYES ET AL. (2010).

### 2.2.1.3 Synthesewege des Milchfetts

Der Fettgehalt in der Milch wird durch die direkte Aufnahme und Biohydrierung von Nahrungsfetten, durch die *de-novo*-Synthese von Fettsäuren im Eutergewebe und durch die Mobilisierung von Körperfett bestimmt (BAUMAN & DAVIS 1974). Die Futterzusammensetzung und die Laktationsphase beeinflussen aus welchen dieser Prozesse die Substrate für die Triglycerid-Biosynthese anteilig stammen (RUDOLPH ET AL. 2007). In der frühen Laktation kommt der Körperfettmobilisierung im Zuge der negativen Energiebilanz die

größte Bedeutung zu (MOE ET AL. 1971). Die Mobilisierung von Körpergewebe führt bei Wiederkäuern zu einer Anflutung von freien Fettsäuren im Blut (DUNSHEA ET AL. 1989). An der variierenden Fettsäurezusammensetzung zeigt sich, dass in verschiedenen Phasen der Laktation unterschiedliche Synthesewege die Milchfettsynthese beeinflussen (STOOP ET AL. 2009; GROSS ET AL. 2011).

Entscheidende physiologische Prozesse des Fettstoffwechsels sind die Triglyceridsynthese, der Fettsäureabbau und die Fettsäuresynthese (Abbildung 2.2). An der Triglyceridsynthese sind die Schlüsselenzyme Glycerol-Kinase (GK), Acylglycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (AGPAT), Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) und Diacylglycerol-O-Transferase (DGAT) beteiligt. Kurz-, mittel- und langkettige Fettsäuren werden an Glycerol zu Triglyceriden verestert und in die Milch sezerniert. Die Aufnahme von Fetten über die Nahrung hat dabei keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression der an der Triglyceridsynthese beteiligten Gene (RUDOLPH ET AL. 2007). Wichtige Enzyme des Fettsäureabbaus sind unter anderem die Lipoprotein-Lipase (LPL) und das Glycosylphosphatidylinositol-anchored-high-density-Lipoprotein-bindende-Protein-1 (GPIHBP1). Die in Chylomikronen und Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL) enthaltenen Fette werden durch die Lipoprotein-Lipase hydrolisiert. GPIHBP1 wirkt als Plattform für die LPL und ist maßgeblich an der Bereitstellung der für die Milchfettsynthese benötigten Fettstoffe beteiligt (HERNELL & OLIVECRONA 1974). In der Phase der frühen Laktation nimmt die Expression von LPL im Fettgewebe ab, so dass die aus der Körperfettmobilisierung stammenden Fettsäuren nicht erneut durch Lipogenese gebunden werden (SUMNER-THOMSON ET AL. 2011) und stattdessen für die Fettsynthese im Euter verfügbar sind. Die Fettsäure-Synthase (FAS) spielt eine zentrale Rolle in der *de-novo*-Fettsäuresynthese. Die katalytischen Zentren von FAS sind an der Umwandlung von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in Palmitinsäure beteiligt. Die Fettsäure-Synthase synthetisiert im Eutergewebe kurzkettige Fettsäuren von C4:0 bis C16:0 (MORRIS ET AL. 2007). In der frühen Laktation um Tag 60 ist das Expressionsmaximum des für die Fettsäure-Synthase kodierenden Gens *FASN* (Bionaz & Loor 2008b). Dennoch ist die *de-novo*-Synthese in der Phase der negativen Energiebilanz relativ gesehen schwächer ausgeprägt, so dass es in der Milch zu einem höheren Anteil von Fettsäuren aus der Körperfettmobilisierung und zu einer Verringerung des Anteils der Fettsäuren aus der *de-novo*-Synthese kommt (VAN KNEGSEL ET AL. 2007).

Die Komplexität des Fettstoffwechsels verdeutlicht, dass es sich bei dem Merkmal Fettgehalt um ein quantitatives Merkmal handelt. Eine Vielzahl an Genen ist an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt (BIONAZ & LOOR 2008a), die eine vollständige Aufklärung der komplexen genetischen Architektur erschweren.

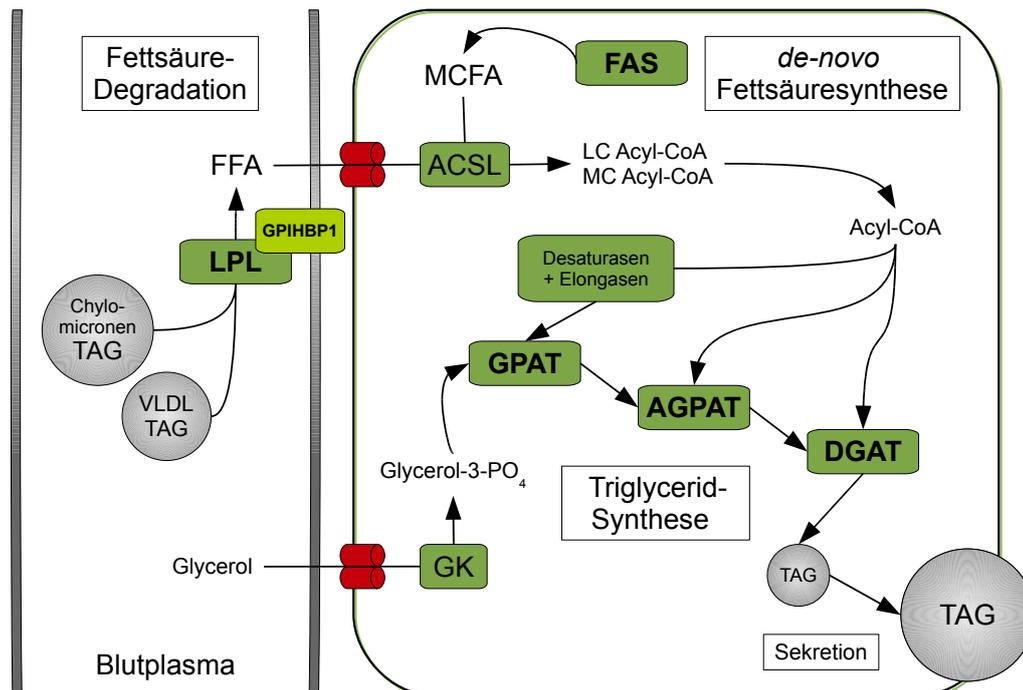


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Fettsynthesewege im Eutergewebe. Aus den Triglyceriden (TAG) der Chylomikronen und Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL) werden durch die Lipoprotein-Lipase (LPL) freie Fettsäuren (FFA) hydrolysiert und in die Euterzelle transportiert. Das Glycosylphosphatidylinositol-anchored-high-density-lipoprotein-bindende Protein-1 (GPIHBP1) wirkt als Plattform für die LPL. Mittellangkettige Fettsäuren (MCFA) aus der de-novo-Synthese mit dem Schlüsselenzym Fettsäure-Synthase (FAS) sowie die aus dem Blutplasma aufgenommenen Fettsäuren werden über die Acyl-CoA-Synthetasen (ACSL) zu mittellangkettigen (MC) und langkettigen (LC) Acyl-CoA-Fettsäuren verestert. Die Glycerol-Kinase (GK) stellt das Glycerol-3-Phosphat bereit. Acyl-CoA-Fettsäuren und Glycerol-3-Phosphat werden anschließend durch die Enzyme Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT), Acylglycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (AGPAT) und Diacylglycerol-O-Transferase (DGAT) zu Triglyceriden synthetisiert. Angelehnt an RUDOLPH ET AL. (2007) und BIONAZ & LOOR (2008b).

### 2.2.2 Bedeutung von Vitamin-D<sub>3</sub> für die Gesundheit von Milchkühen

Das Ausscheiden von Milchkühen aus dem Produktionsprozess ist neben Leistungs- und Fruchtbarkeitsproblemen hauptsächlich auf gesundheitliche Gründe zurückzuführen (WÄNGLER ET AL. 2009). RÖMER (2011) stellt in ihrer Studie an Holstein-Friesian-Kühen fest, dass das Abgangsrisiko für Tiere, die in den ersten 30 Tagen der Laktation an Produktionskrankheiten erkranken, erhöht ist. Wie bereits beschrieben, ist die Stoffwechselbelastung der frühen Laktation ein wesentlicher Bestandteil für das Auftreten von Gesundheitsproblemen. Eine möglicherweise bedeutende und bislang weitestgehend unbeachtete Rolle bei der Gesundheit von Rindern könnte der Vitamin-D-Versorgung zugeschrieben werden.

Vitamin-D<sub>3</sub> ist ein Steroidhormon, das in der Haut aus dem Vorläufermolekül

7-Dehydrocholesterol durch Einstrahlung von UV-B Licht gebildet wird. Vitamin-D<sub>3</sub> wird im Körper über Calcidiol (25-Hydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>) zu Calcitriol (1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) verstoffwechselt. Diese Metaboliten sind im Blut fast vollständig an das Vitamin-D-bindende Protein (VDBP) gebunden (SPEECKAERT ET AL. 2006) und werden zu den Zielorganen transportiert. Zudem ist das Protein in die Bindung von aus lysierten Zellen freigesetztem Aktin sowie in die Verstärkung der Chemotaxis, Makrophagenregulation und Osteoklastenstimulation involviert (GOMME & BERTOLINI 2004). Die Blutserumkonzentration von Calcidiol weist Erblichkeiten von  $h^2=0,8$  auf (WJST ET AL. 2006) und ist mit Polymorphismen im für das Vitamin-D-bindende Protein (VDBP) kodierenden *GC*-Gen assoziiert (BU ET AL. 2010; AHN ET AL. 2010).

Ein akuter Mangel an Vitamin-D wird beim Mensch in Verbindung mit verschiedenen Erkrankungen wie Rachitis, Osteoporose, Knochenbrüche und Osteopenie gebracht (HOLICK 2007; HOLICK & CHEN 2008). Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen einer Unterversorgung mit dem Steroidhormon Vitamin-D<sub>3</sub> und der Inzidenz von Bluthochdruck, Krebs, Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten nachgewiesen (HOLICK & CHEN 2008).

Beim Rind wurden die Auswirkungen von Vitamin-D-Mangel auf die Knochenentwicklung (DOBSON & WARD 1974) und auf den Calcium-Haushalt in der frühen Laktation (HIBBS & CONRAD 1976; HORST ET AL. 1994) beschrieben. Da das Steroidhormon eine entscheidende Rolle in der Calcium-Homöostase spielt, kann eine Unterversorgung bei Milchkühen zu gesundheitlichen Problemen wie Hypokalzämie und Gebärparese führen (HORST ET AL. 1994). Zudem kann eine Vitamin-D-Mangelsituation in aktiver und passiver Weise verschiedene andere Krankheiten oder Störungen auslösen, wie z. B. Wachstumsanomalien, verringerte Fütterungseffizienz oder eine gestörte Fruchtbarkeit (DOBSON & WARD 1974). Aus diesen Gründen wird in Studien die Supplementierung von Vitamin-D in Zusammenhang mit der Vermeidung der Gebärparese und der Verbesserung der Fleischqualität diskutiert (WILKENS ET AL. 2012; CARNAGEY ET AL. 2008). Der Einfluss der Vitamin-D<sub>3</sub>-Versorgung auf das Immunsystem stellt ebenfalls einen wichtigen gesundheitlichen Aspekt dar (REINHARDT & HUSTMYER 1987). Die Erforschung der endokrinen Physiologie und der Funktionen von Vitamin-D im bovinen Immunsystem wurde in den letzten Jahren vorangetrieben, um nicht zuletzt auch Rückschlüsse auf die humane Vitamin-D-Endokrinologie ziehen zu können (NELSON ET AL. 2012). Während beim Menschen Polymorphismen in Genen des Vitamin-D-Stoffwechsels mit dem Vitamin-D-Gehalt und Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten (AHN ET AL. 2010; BU ET AL. 2010; GOZDZIK ET AL. 2011), sind bislang keine Studien zur Aufklärung der genetischen Konstitution beim Rind bekannt.

## 2.3 Genomweite Assoziationsstudien bei komplexen, quantitativen Merkmalen und ihre Anwendung in der genomischen Selektion

Die meisten züchterisch relevanten Phänotypen fallen in die Kategorie der komplexen Merkmale. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass eine Vielzahl an Genen an der Ausprägung der Phänotypen beteiligt ist (GLAZIER ET AL. 2002). Die Identifizierung der den Phänotypen zugrunde liegenden Genorte, der so genannten QTL, wird durch genetische Mechanismen, wie z. B. Epistasie und Pleiotropie (NADEAU 2001), und geringe Merkmalseffekte erschwert. Die Anzahl der untersuchten Individuen, die Dichte der verwendeten Marker und die genetische Architektur des untersuchten Merkmals sind entscheidende Parameter für eine erfolgreiche Identifizierung von QTL (RISCH 2000).

Durch einen enormen Entwicklungsschub im molekularbiologischen Technologiesektor wurde in den letzten Jahren die Grundlage für die Aufklärung komplexer Merkmale geschaffen. Die vollständige Genom-Sequenzierung des Rindes und die Identifizierung zahlreicher Polymorphismen (BOVINE HAPMAP CONSORTIUM ET AL. 2009; BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM ET AL. 2009) hatten einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung kommerziell erhältlicher, boviner SNP-Microarrays. Mit modernen Hochdurchsatz-Genotypisierungsmethoden können nun große Tierzahlen an tausenden, über das Genom verteilten Polymorphismen genotypisiert werden. Die im Rahmen der genomischen Zuchtwertschätzung erfassten Genotypdaten können in GWAS analysiert werden und zur Aufklärung der genetischen Grundlagen von Leistungs- und Gesundheitsmerkmalen beitragen (GODDARD 2008).

Grundsätzlich ist bei der Durchführung genomweiter Assoziationsstudien besonderes Augenmerk auf die statistische Auswertung der Ergebnisse zu legen. Durch das Problem des multiplen Testens entstehen falsch positive Assoziationen, die eine Anpassung der Signifikanzgrenze entsprechend der Anzahl der verwendeten Marker erforderlich machen (HOGGART ET AL. 2008). Zudem müssen Verwandtschaftsbeziehungen beachtet werden, um falsch positive Assoziationen aufgrund von Populationsstratifikation zu vermeiden (MACLEOD ET AL. 2010). Gerade bei Nutztierpopulationen besteht häufig eine geringe effektive Populationsgröße mit relativ engen Verwandtschaftsstrukturen (NOTTER 1999). Zur Bestätigung der assoziierten QTL empfiehlt es sich, die Varianten auf Funktionalität zu überprüfen und die Studie in einer unabhängigen Population zu replizieren (PEARSON & MANOLIO 2008).

Beim Menschen konnten erstmals im Jahr 2005 in einer 100.000 SNP umfassenden, genomweiten Assoziationstudie QTL identifiziert werden, die mit der altersbedingten Makuladegeneration assoziiert sind (KLEIN 2005). In den folgenden Jahren wurden weitere komplexe Merkmale in GWAS analysiert und die zugrunde liegenden genetischen Mechanismen

aufgedeckt (HINDORFF ET AL. 2009). Beim Rind tragen die Ergebnisse aus genomweiten Assoziationsstudien wesentlich zur Aufklärung der genetischen Grundlagen ökonomisch wichtiger Leistungsmerkmale und Krankheiten bei (GODDARD 2008). Die Erkenntnisse aus QTL-Analysen können in der genomischen Selektion praktische Anwendung finden. Auf Basis der mit dem Merkmal assoziierten Marker kann eine genetische Beurteilung der Tiere vorgenommen werden, die in züchterischer Form umgesetzt wird. Um zuverlässige Aussagen über die genetische Konstitution des Tieres treffen zu können, ist es erforderlich, dass der Marker mit dem entsprechenden kausalen Quantitative-Trait-Nukleotid (QTN) im Kopplungsungleichgewicht liegt (HAYES ET AL. 2010). Die Ausdehnung des Linkage Disequilibrium (LD) ist entscheidend für die Anzahl an benötigten Markern. Eine hohe Markerdichte ist daher Voraussetzung für eine erfolgreiche Identifizierung assoziierter SNP (KHATKAR ET AL. 2008). Eine wesentliche Verbesserung der genomischen Selektion auf Basis von Markerinformationen könnte durch die Entwicklung neuer Sequenziermethoden erfolgen. Mit Hilfe der Next-Generation-Sequenzierung (NGS) ist es möglich das gesamte Genom ausgewählter Tiere zu erfassen und systematisch DNA-Varianten zu identifizieren. Die QTN-Genotypen der sequenzierten Tiere werden dann mittels Imputation auf die Population hochgerechnet und direkt in der genomischen Selektion eingesetzt (FRIES & PAUSCH 2011).

In der praktischen Anwendung könnte beispielsweise ein besseres Verständnis der Stoffwechselfvorgänge in der frühen Laktation und des allgemeinen gesundheitlichen Zusammenhangs zur Implementierung spezifischer Marker führen. Der Einsatz dieser Marker in der genomischen Selektion würde eine ökonomische Verbesserung der Milchproduktion herbeiführen und die aus tierethischer Sicht zu kurze Lebensdauer von Milchkühen verbessern.

## 3 Tiere, Material und Methoden

### 3.1 Tiere und Phänotypen

#### 3.1.1 Holstein-Friesian- und Fleckvieh-Bullen der genomweiten Assoziationsstudien

In dieser Arbeit wurden Besamungsbullen der Rassen Holstein-Friesian und Deutsches Fleckvieh (FV) untersucht. Von den abstammungsgeprüften HF-Bullen standen Phänotypinformationen in Form von mittels Best-Linear-Unbiased-Prediction (BLUP) geschätzter Zuchtwerte der Merkmale Milchfettgehalt, Nutzungsdauer (RZN) und Body-Condition-Score zur Verfügung ([www.vit.de](http://www.vit.de), Version April 2010). Zusätzlich wurden vom Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V. (vit) geschätzte Zuchtwerte für den Milchfettgehalt und das Fett-Protein-Verhältnis der Laktationstage 10 bis 20 bereitgestellt. Diese Zuchtwerte wurden für die ersten drei Laktationen mittels Random-Regression-Testtagsmodell geschätzt. Die Testtags-Zuchtwerte der Laktationstage 10 bis 20 wurden über die drei Laktationen hinweg gleich gewichtet, um einen gesammelten Zuchtwert für den Milchfettgehalt der frühen Laktation zu erhalten. Die insgesamt 2401 HF-Bullen stammen von 376 verschiedenen Vätern und 423 maternalen Großvätern ab. Die paternalen Halbgeschwisterfamilien und maternalen Großvaterfamilien umfassen durchschnittlich 6 und maximal 83 Mitglieder (Abbildung 9.1 a und 9.1 b).

Von den Besamungsbullen der Rasse FV standen mittels BLUP geschätzte Zuchtwerte der Merkmale Milchfettgehalt, Persistenz, Milchmenge und Bemuskelung sowie des Selektionsindex Fitness zur Verfügung ([www.lfl.bayern.de/bazi-rind](http://www.lfl.bayern.de/bazi-rind), Version Dezember 2010). Zusätzlich wurden Zuchtwerte für den Fettgehalt jedes Laktationstages der zweiten Laktation aus Random-Regression-Testtagsmodellen über die Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) ([www.lfl.bayern.de](http://www.lfl.bayern.de)) bereitgestellt. Die Daten wurden für jeweils fünf aufeinanderfolgende Laktationstage gemittelt. Die Verwandtschaftsstruktur der insgesamt 3643 abstammungsgeprüften FV-Bullen setzt sich aus 385 verschiedenen Vätern und 487 maternalen Großvätern zusammen, wobei die von 675 Bullen gebildeten paternalen Halbgeschwisterfamilien und maternalen Großvaterfamilien aus durchschnittlich 10 und maximal 288 Mitgliedern bestehen (Abbildung 9.1 c und 9.1 d).

Eine Übersicht über die dieser Studie zugrunde liegenden Phänotypen der HF- und FV-Bullen ist in Tabelle 3.1 sowie in den Abbildungen 9.2 und 9.3 im Anhang dargestellt.

### 3 Tiere, Material und Methoden

Tabelle 3.1: Phänotypen der untersuchten Merkmale der Rassen FV und HF.  $s$  ist die Standardabweichung und  $n$  die Anzahl der Phänotypen des jeweiligen Merkmals.

Merkmal	Rasse	Minimum	Median	Mittelwert	Maximum	$s$	$n$
Persistenz	FV	56	101	100,2	138	11,0	3642
Fitness	FV	58	102	101,3	142	11,6	3642
Bemuskelung	FV	59	102	102,1	144	10,4	3593
Milchmenge [kg]	FV	-2407	108	92,02	1622	466,6	3642
Fettgehalt [%] (Zuchtwert)	FV	-0,93	-0,04	-0,018	1,07	0,2	3642
Nutzungsdauer	HF	66	100	100	137	10,6	2401
Body-Condition-Score	HF	410	820	808	991	88,0	2401
Fettgehalt [%] (Zuchtwert)	HF	-1,11	-0,06	-0,04	1,12	0,31	2401
Fettgehalt [%] (Tag 10-20)	HF	-1,02	-0,20	-0,20	0,62	0,21	2401
FPR (Tag 10-20)	HF	-3,39	-0,69	-0,67	1,90	0,68	2401

#### 3.1.2 Tierpanel für die Resequenzierung von Kandidatengen

Für die Resequenzierung der in der genomweiten Assoziationsstudie identifizierten Kandidatengene *GPAT4*, *GPIHBP1* und *GC*, wurden Panel aus je 12 HF-Tieren erstellt (Tabellen 9.1, 9.2 und 9.3). Die Bullen wurden anhand des Genotyps am signifikantesten Marker aus der genomweiten Genotypisierung sowie aufgrund extremer Phänotypen ausgewählt. Bei der Auswahl der Tiere für das *GPIHBP1*-Panel wurde zudem die Haplotypenstruktur der *DGAT1*-Variante (K232A) (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002) berücksichtigt.

#### 3.1.3 Fleckvieh-Tiere der Next-Generation-Sequenzierung

Für die Identifizierung von SNP in Kandidatengenregionen konnte auf die Sequenzinformation von 43 FV-Tieren aus der genomweiten Resequenzierung mit dem *Illumina HiSeq 2000* (SY-401-1001, Illumina, San Diego, CA, USA) zurückgegriffen werden (siehe 3.7.4). Die Sequenzen standen über das Projekt *AgroClustEr Synbreed* zur Verfügung. Für die Next-Generation-Sequenzierung wurden Tiere ausgewählt, die einen großen Einfluss auf die FV-Population haben, um einen möglichst großen Teil der genetischen Variation zu erfassen (Tabelle 9.4). Die Gründer-Tiere deckten insgesamt 68 % der genetischen Variation der Rasse Deutsches Fleckvieh ab (JANSEN ET AL. 2011).

### 3.2 DNA-Extraktion aus Sperma

Die Aufreinigung der DNA aus Sperma erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von LIEN ET AL. (1990). Die Spermaproben lagen als Spermaröhrchen vor, wie sie in der

künstlichen Besamung eingesetzt werden und waren bis zur Bearbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Sperma wurde mit 1x PBS (50 mM Phosphat-gepufferte Salzlösung, 150 mM NaCl; pH 7,2) aus den Röhren gespült. Um die Bestandteile der dem Ejakulat zugefügten Verdünnungsflüssigkeit zu entfernen, wurden die Proben abzentrifugiert und die Spermien-Pellets in PBS resuspendiert. Die Zellyse erfolgte nach Zugabe von Puffer (10 mM Tris, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % SDS), DTT (1 M) und Proteinase K (20 mg/ml) (7528.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei  $56^{\circ}\text{C}$  für 12 h. Für die Extraktion der Proteine wurden die Proben mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt, mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) vermischt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden in einer Alkohol-Fällung Natrium-Acetat (3 M) und Isopropanol (100 %) zu dem entnommenen Überstand gegeben. Die ausgefallene DNA wurde in Ethanol (70 %) gewaschen und nach Entfernen der Flüssigkeit bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8,0) resuspendiert. Von einem Großteil der Bullen war bereits aufbereitete DNA aus früheren Arbeiten (SEEFRIED 2008) und über das FUGATO-plus Projekt *GenoTrack* am Lehrstuhl für Tierzucht verfügbar.

### 3.3 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der DNA-Proben

Die DNA-Konzentration wurde für die Genotypisierung mit den *Illumina Bovine BeadChips* auf 60 ng/ $\mu\text{l}$ , für die Genotypisierung mittels *TaqMan* auf 2 ng/ $\mu\text{l}$  und für die Amplifikation mittels PCR auf 10 ng/ $\mu\text{l}$  eingestellt. Die Quantifizierung der DNA-Lösungen erfolgte spektralphotometrisch über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem *NanoDrop 1000* Spektrophotometer (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Zusätzlich wurden der Parameter A260/280 zur Überprüfung auf Proteinrückstände und das Verhältnis A260/230 zur Kontrolle auf Verunreinigung aus der Extraktion betrachtet.

Zur Beurteilung der Qualität der DNA wurden die Proben nach Zugabe von *MassRuler DNA Loading Dye* (R0621, Thermo Fisher Scientific (Fermentas), St. Leon-Rot, Deutschland) gelelektrophoretisch mittels 0,8 %igem Agarosegel (0,001 % Ethidiumbromid, 0,5x Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat (TBE)-Puffer, 50 V Spannung, 1 h Laufzeit) mit dem Standard Lambda-DNA (SD0011, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) untersucht. Die Betrachtung der Banden erfolgte unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm. Degradierete oder verunreinigte DNA-Proben wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

### 3.4 PCR

#### 3.4.1 Primerdesign

Das Design der Primer für die Amplifikation mittels PCR erfolgte mit der Software *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (ROZEN & SKALETSKY 2000) auf Grundlage der Sequenzinformation des bovinen UMD3.1-Assemblys (ZIMIN ET AL. 2009). Die Einstellungen wurden so gewählt, dass die Primer eine Länge von 20 Nukleotiden bei einem GC-Gehalt von etwa 50 % aufwiesen. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 57 und 63 °C mit einem Optimum von 60 °C liegen. Beim Primerdesign wurde zudem darauf geachtet, dass die Komplementarität der Primer schwach war, um die Wahrscheinlichkeit für Primerdimerbildung oder Rückfaltungen möglichst gering zu halten. Die Primer wurden so angepasst, dass die amplifizierten Produkte eine Länge von 450 bis 800 Basen hatten. Die Primer sind in Tabelle 9.5 im Anhang aufgeführt.

#### 3.4.2 Standard-PCR

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). Für die PCR wurden die lyophilisierten Primer zunächst in Tris-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0) eluiert. Die Konzentration der so erstellten Primer-Stammlösung betrug 100 µM. Aus dieser Lösung wurden Arbeitslösungen (5 µM) durch Verdünnung mit Tris-Puffer pipettiert. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem 20 µl Ansatz bestehend aus 1x *Coral Load PCR Puffer* mit 15 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Hilden, Deutschland), 0,2 mM dNTP-Mix (K039.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), je 0,25 µM des Forward- bzw. Reverse-Primers, 1 U Taq-Polymerase (201203, Qiagen, Hilden, Deutschland) und 10 ng genomischer DNA pipettiert. Die in einem *TProfessional Basic Gradient*-Thermocycler (070-601, Analytik Jena (Biometra), Jena, Deutschland) standardmäßig angewendeten Temperaturabläufe umfassten eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 4 min, die zyklische Wiederholung der Schritte Denaturierung 95 °C für 40 s, Annealing 60 °C für 1 min und Elongation bei 72 °C für 1 min sowie einen finalen Elongationsschritt bei 72 °C für 4 min. In der Standardeinstellung wurden 30 Zyklen implementiert.

Die Überprüfung der PCR erfolgte mit einem 1,5 %igen Agarosegel (0,001 % Ethidiumbromid, 0,5x TBE-Puffer, 100 V Spannung, 30 min Laufzeit). Als Längenstandard wurde die *GeneRuler 100bp-DNA-Ladder* (SM0241, Thermo Fisher Scientific (Fermentas), St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

### 3.4.3 PCR-Optimierung

Nicht alle Primer amplifizierten unter den gewählten Standardeinstellungen (Tabelle 9.5). Für die Verbesserung der PCR-Resultate wurde zunächst die optimale, primerspezifische Annealingtemperatur unter Anwendung eines Temperaturgradienten mit 12 Temperaturschritten (54,0 °C, 54,3 °C, 55,0 °C, 56,0 °C, 57,2 °C, 58,4 °C, 59,6 °C, 60,8 °C, 62,0 °C, 63,0 °C, 63,7 °C sowie 64,0 °C) ermittelt. Bei schwachen Resultaten wurde die Zyklenzahl auf 35 erhöht. Zusätzlich wurde *Q-Lösung* (finale Konzentration 1x) (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) (finale Konzentration 5 %) (D9170, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) dem Mastermix zugefügt. Fragmente die einen hohen Anteil an Guanin (G) und Cytosin (C) aufwiesen, wurden mit der *AccuPrime GC-Rich* DNA-Polymerase (12337016, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) amplifiziert. Der Ansatz bestand aus 1x Puffer A mit 2 mM MgSO<sub>4</sub>, je 0,25 µM des forward bzw. reverse Primers, 0,6 U Polymerase und 10 ng genomische DNA.

## 3.5 Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode nach SANGER ET AL. (1977) unter Verwendung der *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing* Reagenzien (4337450, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und des *ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer* (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

### 3.5.1 Aufreinigung der PCR

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte enzymatisch durch Einsatz von 2 U Exonuklease I (EN0581, Thermo Fisher Scientific (Fermentas), St. Leon-Rot, Deutschland) zum Verdau einzelsträngiger DNA-Moleküle, wie z. B. überschüssiger Primer und 0,4 U alkaline Phosphatase *FastAP* (EF0654, Thermo Fisher Scientific (Fermentas), St. Leon-Rot, Deutschland) zur Dephosphorylierung der dNTP. Der Aufreinigungsansatz wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert und die Enzyme anschließend bei 80 °C für 15 min deaktiviert. Die Lagerung des aufgereinigten PCR-Produkts erfolgte bei -20 °C.

### 3.5.2 Sequenzierreaktion, Aufreinigung und Kapillargelelektrophorese

Die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen basierten auf dem *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (4337450, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Die Sequenzierreaktion wurde in einem 10 µl Ansatz bestehend aus 0,25 µM Primer, 1x *BigDye*

*Terminator*, 1x *BigDye Sequenzierpuffer*, 1x Dilutionpuffer (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM Tris-HCl pH 8,0) und dem aufgereinigten PCR-Produkt durchgeführt. Die Temperaturabläufe waren eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 20 s und in 25 Zyklen ablaufende Denaturierung bei 95 °C für 12 s, Annealing bei 51 °C für 8 s und Elongation bei 60 °C für 4 min.

Anschließend wurde die Sequenzierreaktion mit der Sephadex-Gelfiltrationsmethode aufgereinigt. Zunächst wurden 25 mg *Sephadex G-50* (G5050-100G, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) volumetrisch abgemessen und in *MultiScreen HV* Platten (MAHVN4510, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) mit Wasser versetzt. Das Aufquellen erfolgte durch Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h. Anschließend wurde die Platte abzentrifugiert (960 g, 5 min) um überschüssiges Wasser zu entfernen. Die Sequenzierreaktion wurde mit 0,1 mM EDTA verdünnt, auf die Sephadex-Platte pipettiert und mittels Zentrifugation (960 g, 5 min) aufgereinigt.

Die Auftrennung der Fragmente durch Kapillargelelektrophorese erfolgte im *ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer* (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) unter Verwendung des Polymers *3130 POP-7* (4352759, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und einer 36 cm *3130xl & 3100*-Kapillare (4315931, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) unter Standardeinstellungen. Für die Erfassung der Daten wurde die *Run 3130xl Data Collection Software* (v.3.0) verwendet.

#### 3.5.3 Analyse der Sequenzen auf Polymorphismen

Die qualitative Beurteilung, sowie das Calling der Basen erfolgten durch die *AB Sequencing Analysis Software* (v5.2). Die vorliegenden Polymorphismen wurden durch den Vergleich der im Panel sequenzierten Tiere unter Verwendung der *Phred/Phrap/Polyphred/Consed*-Software (EWING & GREEN 1998; EWING ET AL. 1998; GORDON ET AL. 1998; NICKERSON ET AL. 1997) detektiert. Die gefundenen Varianten erhielten eine interne SNP-Identifikationsnummer (SNP-ID).

### 3.6 Genotypisierung und Imputation

#### 3.6.1 Genotypisierung mit der *TaqMan*-Methode

Die Genotypisierung ausgewählter Polymorphismen aus der Resequenzierung der Kandidatengene wurde unter Verwendung des *ABI 7500 Fast Real-Time* PCR-Systems (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Erstellung des Assays erfolgte durch Life Technologies (Darmstadt, Deutschland). Bei den Genen *GPAT4*, *GPIHBP1* und

GC wurden die Sequenzen aus der Resequenzierung des Tierpanels als Grundlage verwendet, bei *DGAT1* und *GHR* die Assembly-Sequenz im Bereich der bekannten Mutation. Der Versuchsansatz setzte sich aus dem SNP-spezifischen Assay, dem *TaqMan Genotyping Master Mix* (4332075, 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 s und Annealing/Elongationsschritte bei 60 °C für 1 min. Anschließend wurde im Post-Read (60 °C für 1 min) die Fluoreszenz gemessen. Das Calling der Genotypen erfolgte über die *7500 Software* (v2.0.5). Threshold für die Qualität der Amplifikation war ein Wert von 95. Die mittels *TaqMan*-Genotypisierung untersuchten Polymorphismen der Gene *DGAT1*, *GHR*, *GPAT4*, *GPIHBP1* und *GC*, sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendeten *TaqMan*-Assays. *f* steht für forward- und *r* für reverse-Primer.

Gen	SNP	Allele	Sonden (5' > 3')	Primer (5' > 3')
<i>DGAT1</i>	K232A	AA	VIC: CGTTGGCCTTCTTAC	f: CGCTTGCTCGTAGCTTTGG
		CG	FAM: TTGGCCGCCTTAC	r: CGCGGTAGGTCAGGTTGTC
<i>GHR</i>	F279Y	A	VIC: AGCAGTGACATTATATTTACT	f: TCAGATTTCCAGTTTCCATGGTTCCTTAATTATT
		T	FAM: TAGCAGTGACATTATTTTACT	r: GGTTATATCACACTTACCTTGCTGTTTAGA
<i>GPAT4</i>	TUM-3974	GA	VIC: CTCCTCACTGTCCCCAC	f: GCATCCGGAGTGTCTAATGTTG
		T-	FAM: TCCTCACTGACCCAC	r: GGCACACTCCAAGGAGAAGATG
<i>GPAT4</i>	TUM-3994	G	VIC: CTCTCCCTCACCCGCC	f: CGGCCAGCCAGTGT
		A	FAM: CTCTCCCTTACCCGCC	r: ACAGGAACGAACCCCAAACC
<i>GPIHBP1</i>	TUM-4128	A	VIC: CACCGTCAACTACGAGTC	f: CAAGGCCCTGGAGATGAC
		G	FAM: CCGTCAACCACGAGTC	r: AGCTGCAGACCGCTGAG
<i>GC</i>	TUM-4005	G	VIC: CTGTTATCTGCAAAATG	f: CAAGTCACAGAGCTGGAGTTTA
		T	FAM: TTCTGTTATCTTCAAAATG	r: GGCCTTGTAATGCAGAATCCACTA

#### 3.6.2 Genomweite Genotypisierung und Qualitätskontrolle

Von den 2401 HF-Bullen standen Genotypinformationen aus der genomweiten Genotypisierung mit dem *Illumina BovineSNP50 BeadChip* an 54.001 SNP (Version 1, WG-31-120, Illumina, San Diego, CA, USA) zur Verfügung. Bei 2545 bzw. 842 der FV-Bullen konnte auf Genotypdaten aus der Analyse mit dem *Illumina BovineSNP50 BeadChip* an 54.001 (Version 1, WG-31-120, Illumina, San Diego, CA, USA) bzw. an 54.609 SNP (Version 2, WG-450-2001, Illumina, San Diego, CA, USA) zurückgegriffen werden. Von 810 FV-Tieren standen Genotypinformationen aus der Analyse mit dem *Illumina BovineHD BeadChip* an 777.962 SNP (WG-450-1002, Illumina, San Diego, CA, USA) bereit. Die Daten wurden mittels Imputation so aufbereitet (vgl. PAUSCH ET AL. (2012b)), dass für die Analysen 658.385 Genotypen von 3643 FV-Bullen vorlagen (siehe 3.6.3). Die Daten standen über die Projekte FUGATO-plus *GenoTrack* und *AgroClustEr Synbreed* zur Verfügung. Die Genotypisierung wurde an der *iScan*-Genotypisierplattform (Illumina, San Diego, CA, USA) nach Hersteller-Protokollen im Rahmen der Projekte FUGATO-plus *GenoTrack*

(FKZ 0315134) und *AgroClustEr Synbreed* durchgeführt. Das Genotypen-Calling erfolgte mit dem *Illumina BeadStudio* (SW-10-101, Illumina, San Diego, CA, USA).

Die chromosomalen Positionen der einzelnen SNP wurden auf Grundlage des UMD3.1 Assemblies für das bovine Genom (ZIMIN ET AL. 2009) angegeben. Einzelbasenaustausche mit unbekannter, Y-chromosomaler oder mitochondrialer Position wurden aus den Analysen ausgeschlossen. Die Qualitätskontrolle der Genotypisierung wurde mit *PLINK* (v1.07) (PURCELL ET AL. 2007) für jede Rasse, bzw. jeden BeadChip-Typ getrennt vorgenommen. Tiere mit weniger als 90 % gecallter Genotypen wurden aus weiteren Analysen ausgeschlossen. Des Weiteren wurden SNP die bei weniger als 90 % der Tiere gecallt wurden, eine Frequenz des seltenen Allels (Minor-Allelfrequenz, MAF) von kleiner 0,01 bei HF bzw. kleiner 0,005 bei FV aufwiesen oder nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ( $P < 0,001$  bei HF,  $P < 0,0001$  bei FV) lagen in weiteren Analysen nicht berücksichtigt. Zusätzlich wurde die genomische Verwandtschaft nach VANRADEN (2008) für jedes Tierpaar innerhalb der beiden Rassen berechnet und mit den Pedigree-basierten Verwandtschaftskoeffizienten verglichen, um die Identität der Proben zu bestätigen. Bei Unstimmigkeiten wurden die Tiere aus dem Datensatz entfernt. Nach der Qualitätskontrolle standen die Daten von insgesamt 2327 Holstein-Friesian-Bullen und 44.280 SNP für genomweite Assoziationsstudien bereit (vgl. WANG ET AL. (2012)).

#### 3.6.3 Imputation

Von 3643 FV-Tieren und 658.385 SNP standen Genotypinformationen zur Verfügung, die im Vorfeld mittels Imputation aufbereitet wurden (vgl. PAUSCH ET AL. (2013)) und anschließend eine durchschnittliche Genotypenrate von 99,68 % aufwiesen. Hierfür wurden die Datensätze aus der Genotypisierung der FV-Bullen mit dem *Illumina BovineSNP50 BeadChip* Version 1, Version 2 und dem *Illumina BovineHD BeadChip* kombiniert und fehlende Genotypen mit *Beagle* (BROWNING & BROWNING 2009) und *Minimac* (HOWIE ET AL. 2012) imputiert. Sporadisch fehlende Genotypen aus der Genotypisierung mit *TaqMan*, sowie aus der Genotypisierung der HF-Bullen mit dem *Illumina BovineSNP50 BeadChip* wurden mit *Beagle* (BROWNING & BROWNING 2009) imputiert.

### 3.7 In-silico-Analysen

#### 3.7.1 Auswahl und Annotation der Kandidatengene

Die Auswahl der Kandidatengene erfolgte sowohl unter funktionellen als auch positionellen Gesichtspunkten. Ausgehend von den Ergebnissen der Assoziationsstudien wurden alle

Gene die in den flankierenden Bereichen ( $\pm 2,5$  Mb) um die signifikantesten Marker lokalisiert waren auf funktionelle Zusammenhänge mit den jeweiligen phänotypischen Merkmalen überprüft. Zusätzlich wurde auf Grundlage der genomweiten Sequenzierung der FV-Gründertiere ein Screening nach möglichen kausalen Varianten in den Kandidatengenen durchgeführt. Die Position der Gene basierte auf der UMD3.1-Annotation (Center for Bioinformatics and Computational Biology der University of Maryland).

Für die Vorhersage der Genstruktur der Kandidatengene wurde das Software-Tool *GENOMETHREADER* (GREMME ET AL. 2005) verwendet. Basierend auf dem UMD3.1 Assembly des bovinen Genoms (ZIMIN ET AL. 2009) wurden die mit *MegaBLAST Bos taurus* (<http://blast.cbcb.umd.edu/megablast.html>) lokalisierten Referenzsequenzen der Genregionen in das *GENOMETHREADER*-Tool impliziert. Die Vorhersage der Genstruktur erfolgte über den bovinen Genindex (Dana-Farber Cancer Institute, 12.0) (QUACKENBUSH ET AL. 2001) unter Verwendung von Expressed-Sequenz-Tags (ESTs) der Spezies Mensch, Maus, Ratte, Schwein, Hund und Rind. Anschließend wurde die erzeugte *.xml*-Datei mit dem *Apollo Annotation and Curation Tool* (v.6.1) (LEWIS ET AL. 2002) editiert.

#### 3.7.2 Genomische Charakterisierung der Kandidatengene

Die Konservierung der DNA- und Aminosäuresequenzen wurde anhand von Multiple-Sequence-Alignments mit *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (LARKIN ET AL. 2007) untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Sequenzen aus den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) von verschiedenen Spezies verwendet. Die Bestimmung des Konservierungsgrads wurde über den paarweisen Vergleich zweier Sequenzen durchgeführt. Die Abkürzungen der Aminosäuren sind entsprechend der IUPAC-Nomenklatur (International Union of Pure and Applied Chemistry) angegeben.

Für die Vorhersage des Promotors und Transkriptionsstarts wurde die Software des *Berkeley Drosophila Genome Projects Neural Network Promoter Prediction* ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) (REESE 2001) verwendet. Die dem *Neural Network Promoter Prediction* Tool zu Grunde liegenden Algorithmen ermöglichen die Lokalisierung eukaryotischer Kernpromotorregionen. Für die Vorhersage wurden die Standardeinstellungen gewählt. Die Ermittlung von TATA-Signalen wurde mit dem Online-Tool *HCtata* ([http://zeus2.itb.cnr.it/webgene/wwwHC\\_tata.html](http://zeus2.itb.cnr.it/webgene/wwwHC_tata.html)) von *WEB-GENE* durchgeführt. Die Identifizierung von CpG-Inseln in der 5'-flankierenden Region erfolgte mit der Software *EMBOSS CpGplot* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) des European Bioinformatics Institute unter Verwendung der Standardeinstellungen.

Für alle Polymorphismen, die bis zu 1500 bp vor dem vorhergesagtem Transkriptionsstart liegen, wurde mit der Software *ConTra* (<http://bioit.dnbr.ugent.be/ConTra/index.php>) (HOOGHE ET AL. 2008) unter Verwendung der *TransFac*-Matrix untersucht, ob es sich um mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) handelt. Als Sequenzvorlage wurden die Sequenzen des jeweiligen Gens der NCBI-Datenbank und das *UCSC-multiz-17-way-5000-upstream-Alignment* eingesetzt. Es wurden die Standardeinstellungen verwendet. Für die Erhöhung der Spezifität wurde der Konservierungsgrad orthologer Promotorsequenzen betrachtet. Die vorhergesagten Transkriptionsfaktoren wurden auf bekannte Zusammenhänge mit dem untersuchten Merkmal, sowie auf Gewebe-spezifische Regulation überprüft. Für die Visualisierung wurde *Jalview* (<http://www.jalview.org/>) (WATERHOUSE ET AL. 2009) eingesetzt. In Sequenzbereichen, die in *ConTra* nicht in den multi-Spezies-Alignments enthalten waren, wurde mit *AliBaba2.1* (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) auf Basis der *TransFac*-Matrix nach möglichen TFBS gesucht.

Die Auswirkung von Aminosäureaustauschen auf die Peptidstruktur und -funktionalität wurde mit dem Programm *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (ADZHUBEI ET AL. 2010) überprüft. Der Einfluss synonyme Mutationen und Polymorphismen in intronischen Regionen wurde über den *Human Splicing Finder* (<http://www.umd.be/HSF/>) (DESMET ET AL. 2009) untersucht. Dabei wurden Exon-Splice-Enhancer (ESE) und Exon-Splice-Silencer (ESS) für synonyme Austausch in den Exons sowie mögliche Branch-Point-Positionen für Polymorphismen in den Introns betrachtet.

Für die Identifizierung von Poly-A-Signalen wurde das Online-Tool *PolyAH* von Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) eingesetzt. Die posttranskriptionale, regulatorische Bedeutung von Polymorphismen im 3'-untranslatierten Bereich (UTR) wurde mit *MicroCosm Targets* (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/cgi-bin/targets/v5/search.pl>) von EMBL-EBI und *TargetScanHuman 6.1* (<http://www.targetscan.org/>) analysiert. Anhand des Konservierungsgrades der Sequenz sollten Bindestellen von microRNAs (miRNA) vorhergesagt werden.

#### 3.7.3 Analyse des Kopplungsungleichgewichts

Aus den Genotypen der Polymorphismen der in den Tierpanel resequenzierten Kandidatengene sowie der NGS-Daten der FV-Gründertiere wurde mit der Software *Haploview* (BARRETT ET AL. 2005) das Kopplungsungleichgewicht als  $r^2$  bestimmt und graphisch als LD-Plot dargestellt. Zusätzlich wurden die Allelfrequenzen innerhalb des sequenzierten Tierpanels bestimmt. Polymorphismen die ein hohes Kopplungsungleichgewicht mit dem signifikantesten Marker aus der genomweiten Genotypisierung aufwiesen, wurden als

mögliche Kandidaten-Polymorphismen angesehen und *in-silico* auf mögliche Kausalität überprüft. SNP mit einer Allelfrequenz  $<0,05$  und einem LD mit  $r^2 < 0,2$  zum jeweiligen Topmarker wurden nicht weiter berücksichtigt. Ausnahme bildeten Varianten in den kodierenden Bereichen (nicht-synonyme und synonyme Austausch). Für SNP die innerhalb des Tierpanels ein vollständiges Kopplungsungleichgewicht aufwiesen und als funktionelle Kandidaten identifiziert werden konnten, wurde ein SNP repräsentativ ausgewählt und mittels *TaqMan*-Genotypisierung an einer größeren Tieranzahl genotypisiert.

### 3.7.4 Analyse der Polymorphismen aus der Next-Generation-Sequenzierung

Zur Identifizierung von Polymorphismen in Kandidatengenomen konnte auf Next-Generation-Sequenzierungs-Daten aus dem Projekt *AgroClustEr Synbreed* zurückgegriffen werden (vgl. JANSEN ET AL. (2011)). Die genomweite Sequenzierung einflussreicher Gründer-Tiere der Rasse FV wurde mit dem *Illumina HiSeq 2000* am Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Die Länge der Paired-End Reads betrug 100 bp. Die Reads wurden mit dem *Burrows-Wheeler Alignment Tool* (LI & DURBIN 2009) an die Referenzsequenz aligniert. Als Referenzsequenz wurde das UMD3.1 Assembly des bovinen Genoms (ZIMIN ET AL. 2009) verwendet. Die Identifizierung der Polymorphismen sowie die Ableitung der Genotypen erfolgte über multi-sample SNP-Calling mit der in *SAMtools* implementierten *mpileup*-Funktion und mit *BCFtools* (Li et al. 2009). Fehlende Genotypen wurden mit *Beagle* (BROWNING & BROWNING 2009) imputiert. Es standen Genotypinformationen von 17,3 Millionen Polymorphismen und 43 FV-Tieren zur Verfügung. Die mittlere Abdeckung war 7,5-fach.

Für die Detektion von Varianten in den Kandidatengenomen wurde die Region auf  $\pm 2000$  Basen um den transkribierten Bereich des jeweiligen Gens eingegrenzt. Der gewählte Bereich richtete sich nach Angaben der Genpositionen aus der UMD3.1-Annotation bzw. bei nicht vollständig bekannter Genstruktur nach den Ergebnissen der Annotation mittels *GENOMETHREADER* (GREMME ET AL. 2005) und *Apollo Annotation and Curation Tool* (v.6.1) (LEWIS ET AL. 2002). Zusätzlich wurden die Genotypen der Gründer-Tiere an den signifikantesten SNP aus der GWAS des jeweiligen Merkmals abgefragt. Insertionen und Deletionen, sowie strukturelle Varianten wurden bei dem Screening nach Polymorphismen nicht erfasst. Die qualitative Beurteilung der Genotypen erfolgte über die durchschnittliche Abdeckung des Polymorphismus bei den 43 sequenzierten Tieren.

### 3.7.5 Deskriptive Statistik

Die Analysen der deskriptiven Statistik wurden mit der Open-Source-Software *R* ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) durchgeführt. Der Test auf Normalverteilung der Phänotypen erfolgte nach

dem Shapiro-Wilk-Index. In der Berechnung der Korrelationen wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient verwendet.

#### 3.7.6 Genomweite Assoziationsstudien

Die genomweiten Assoziationsstudien wurden mittels Varianz-Komponenten-basiertem Ansatz durchgeführt. Um den Effekt der Populationsstratifikation zu berücksichtigen und falsch positive Assoziationen zu vermeiden, wurde *EMMAX* (KANG ET AL. 2010) entsprechend dem Modell:

$$y = Xb + u + \epsilon$$

verwendet, wobei  $y$  der Vektor der geschätzten Zuchtwerte des jeweiligen untersuchten Merkmals,  $b$  der fixe SNP-Effekt,  $X$  die Design-Matrix der SNP-Genotypen,  $u$  der zufällige polygene Effekt und  $\epsilon$  der Umwelteffekt ist.

Der zufällige polygene Effekt wurde als normalverteilt angenommen ( $0, \sigma_a^2 G$ ), mit  $\sigma_a^2$  als additive genetische Varianz und  $G$  als genomische Verwandtschaftsmatrix (GRM) der 2327 Holstein-Friesian-Bullen bzw. der 3643 Fleckvieh-Bullen basierend auf 44.280 SNP bzw. 658.385 SNP, entsprechend VanRaden (VANRADEN 2008). In der Assoziationsstudie bei Holstein-Friesian wurden SNP mit  $P < 1,13 \times 10^{-6}$ , bei Fleckvieh SNP mit  $P < 7,59 \times 10^{-8}$  entsprechend der Bonferroni-korrigierten Signifikanzgrenze, als signifikant auf genomweiter Ebene angesehen. Für die Berechnung der chromosomalen Signifikanzgrenze für den *Illumina BovineSNP50 BeadChip* bei HF wurde die Anzahl der SNP des jeweiligen Chromosoms verwendet und ebenfalls nach Bonferroni korrigiert.

Bei den Merkmalen Fettgehalt-Zuchtwert und Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20 wurde das Modell um den K232A-Genotyp des *DGAT1*-Gens erweitert, um Assoziationen die ausschließlich aufgrund eines starken Kopplungsungleichgewichts mit dieser Variante auftreten, zu filtern. Das angepasste Modell:

$$y = Qa + Xb + u + \epsilon$$

enthält zusätzlich zu den oben beschriebenen Variablen,  $Q$  als Design-Matrix der K232A-Genotypen und  $a$  als fixen Effekt der K232A-Substitution.

### 3.7.7 Bestimmung des chromosomalen Anteils an der Zuchtwert-Varianz

Für die Bestimmung des Anteils eines Chromosoms oder QTL an der Zuchtwert-Varianz und der additiv-genetischen Varianz eines Merkmals wurde eine genomische Verwandtschaftsmatrix für jedes Chromosom sowie für die detektierten QTL aufgestellt. Alle SNP innerhalb eines 5 Mb umfassenden Intervalls um den signifikantesten Marker aus der GWAS bildeten die genomische Verwandtschaftsmatrix des QTL, wohingegen die übrigen SNP dem jeweiligen Chromosom zugeordnet wurden. Unter Verwendung von *GCTA* (YANG ET AL. 2011) wurde das Modell:

$$y = \sum_{i=1}^n g_i + e$$

angewandt, mit  $y$  als Vektor der jeweiligen Zuchtwerte,  $g$  als Vektor der genetischen Effekte der  $i$ -ten Chromosomen bzw. QTL,  $n$  als Anzahl der Chromosomen und QTL und  $e$  als Vektor der Zufallseffekte.  $g_i$  wurde als normalverteilt angenommen mit  $N(0, G_i \sigma_{g_i}^2)$ , wobei  $G_i$  die Verwandtschaftsmatrix basierend auf SNP des  $i$ -ten Chromosoms bzw. QTL darstellt. Der Anteil der Varianz, der dem entsprechenden QTL bzw. Chromosom zugeordnet werden konnte, berechnete sich aus der Formel:

$$\sigma_i^2 / (\sum_{i=1}^n \sigma_j^2 + \sigma_e^2)$$

Der Anteil an erklärter Varianz für den *GPIHBP1*-Locus wurde über:

$$2p(1-p)\alpha^2 / \sigma_{ZW}^2$$

bestimmt, mit  $p$  als Frequenz des seltenen Allels,  $\alpha$  als Allel-Substitutionseffekt der assoziierten SNP und  $\sigma_{ZW}^2$  als Zuchtwert-Varianz.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Stoffwechselstatus in der frühen Laktation

#### 4.1.1 Genomweite Assoziationsstudien bei Holstein-Friesian

Nach der Qualitätskontrolle der Ergebnisse aus der genomweiten Genotypisierung standen die Daten von insgesamt 2327 HF-Bullen und 44.280 SNP für die GWAS mit den Merkmalen Fettgehalt-Zuchtwert (FPro-ZW), Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20 (FPro10-20) und Fett-Protein-Verhältnis der Laktationstage 10 bis 20 (FPR10-20) zur Verfügung. Als genomweite Signifikanzgrenze wurde ein P-Wert von  $P=1,13 \times 10^{-6}$  (Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze) angenommen.

##### 4.1.1.1 Fettgehalt-Zuchtwert

Mittels Varianz-Komponenten-basiertem Ansatz wurden in der GWAS für das Merkmal FPro-ZW vier QTL auf den Chromosomen 5, 14, 20 und 27 identifiziert (Abbildung 4.1 a).

Insgesamt sieben genomweit signifikant assoziierte SNP grenzen die Region auf BTA5 auf den Bereich zwischen 91,2 und 97,1 Mb ein. Der signifikanteste Marker Hapmap49734-BTA-74577 ( $P=2,00 \times 10^{-13}$ ) liegt im zweiten Intron des für das Epidermal-Growth-Factor-Receptor-Pathway-Substrat-8 (EPS8) kodierenden Gens. *EPS8* beeinflusst den Glucose-, Triglycerid- und Cholesterolspiegel im Blut (TOCCHETTI ET AL. 2010) und kann daher als funktionelles Kandidatengen für Milchfett-Merkmale angesehen werden.

Die auf BTA14 assoziierte Region wird von 48 hoch signifikanten SNP eingegrenzt (1,46 bis 7,31 Mb) und beinhaltet das *DGAT1*-Gen. Dieses Gen wurde bereits mehrfach als wichtiges Element in Zusammenhang mit Milchleistung und -zusammensetzung beschrieben (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002; SCHENNINK ET AL. 2007). Der signifikanteste Marker ARS-BFGL-NGS-4939 ( $P=1,57 \times 10^{-198}$ ) liegt 1149 bp in 5'-Richtung der als kausal postulierten K232A-Substitution von *DGAT1* (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002).

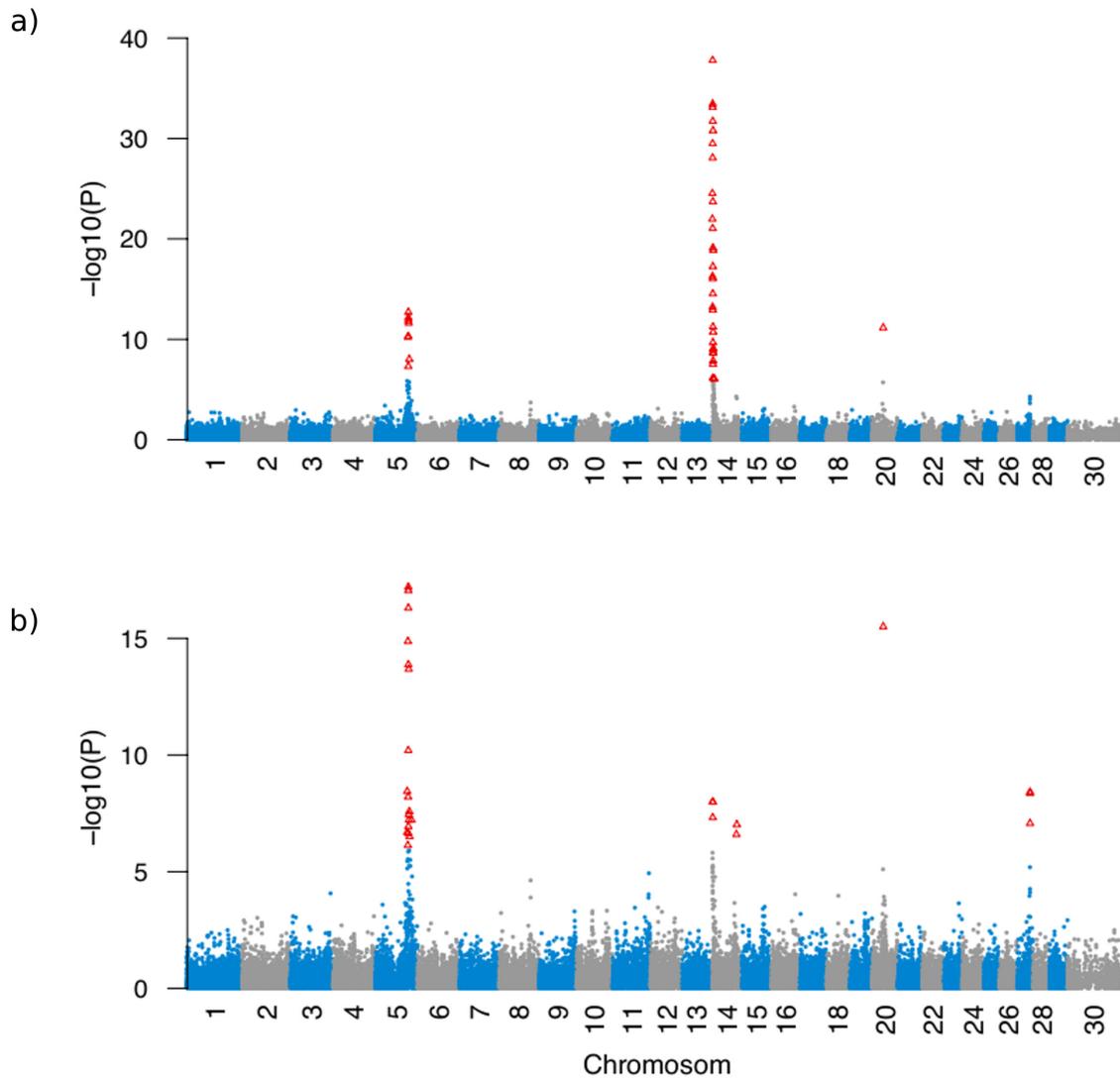


Abbildung 4.1: Manhattan-Plot der Ergebnisse aus der GWAS für das Merkmal Fettgehalt-Zuchtwert a) vor und b) nach der Korrektur auf die K232A-Substitution in DGAT1. Die physikalische Position ist dem UMD3.1-Assembly entsprechend auf der x-Achse, der negative dekadische Logarithmus der P-Werte auf der y-Achse aufgetragen. Rote Dreiecke entsprechen genomweit signifikanten SNP mit  $P < 1,13 \times 10^{-6}$  (Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze). Das Signal auf BTA14 bei a) ist nicht vollständig dargestellt. Der signifikanteste SNP auf BTA14 weist einen Wert von  $P = 1,57 \times 10^{-198}$  auf.

Um Assoziationen die aufgrund des hohen Kopplungsungleichgewichts mit dieser Variante auftreten auszuschließen, wurde eine weitere Analyse unter Einbeziehung des K232A-Polymorphismus von *DGAT1* durchgeführt. Durch diese Korrektur konnten zwei weitere QTL auf BTA14 (bei 2,5 und 71 Mb) identifiziert werden (Abbildung 4.1 b). Der QTL bei 2,5 Mb wird von drei signifikanten SNP eingegrenzt. Der am signifikantesten assoziierte Marker Hapmap30374-BTC-002159 ( $P=1,02 \times 10^{-8}$ , Position 2.468.020 bp) ist 84 kb in 3'-Richtung vom Translationsstart des Gens *GPIHBP1* entfernt. Das für das Glycosylphosphatidylinositol-anchored-high-density-Lipoprotein-bindende Protein-1 kodierende Gen wurde bereits in Zusammenhang mit dem Fettanteil in der humanen Milch und einer veränderten Fettsäurezusammensetzung beschrieben (OLIVECRONA ET AL. 2010). Es stellt daher ein funktionelles Kandidatengen dar. Der zweite QTL auf BTA14 wird von zwei signifikant assoziierten Markern bei 70,0 und 71,1 Mb bestimmt. Für diese Region konnten keine funktionellen Zusammenhänge zwischen positionellen Kandidatengen und dem Milchfettgehalt hergestellt werden.

Die assoziierte Region auf Chromosom 20 deutet auf das Kandidatengen *GHR* hin. Das für den Wachstumshormon-Rezeptor kodierende Gen wurde bereits mit Milchmerkmalen in Verbindung gebracht (FALAKI ET AL. 1997; BLOTT ET AL. 2003; VIITALA ET AL. 2006). Der signifikanteste SNP BTA-84181-no-rs ( $P=1,95 \times 10^{-6}$ ) ist 357 kb in 3'-Richtung von der als kausal beschriebenen F279Y-Substitution des *GHR*-Gens (BLOTT ET AL. 2003) entfernt.

Der Marker ARS-BFGL-NGS-57448 auf BTA27 liegt mit  $P=9,83 \times 10^{-5}$  unter dem Grenzwert für genomweite Signifikanz ( $P=1,13 \times 10^{-6}$ ), zeigt aber eine chromosomenweit signifikante Assoziation. Das Kandidatengen *GPAT4* ist 56 kb vom Topmarker entfernt. *GPAT4* kodiert für das Enzym Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase-4 aus der Triglycerid-Biosynthese.

Die jeweils signifikantesten Polymorphismen der GWAS sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

### **Anteil der QTL an der additiv-genetischen Varianz**

Die 44.280 analysierten SNP erklären insgesamt 87,1 % der Zuchtwert-Varianz. Der größte Teil der additiv-genetischen Varianz wurde BTA14 (40,4 %), BTA5 (13,1 %) und BTA20 (8,9 %) zugewiesen (Abbildung 4.2, Tabelle 9.7). BTA27 erklärt nur einen geringen Anteil (1,2 %), obwohl auf diesem Chromosom eine signifikante Assoziation detektiert wurde. Auf die QTL der einzelnen Chromosomen bezogen, fällt der größte Anteil der additiv-genetischen Varianz dem *DGAT1*-Locus auf BTA14 zu (37,7 %). Dem *EPS8*-Locus wurden 9,52 %, dem *GHR*-Locus 7,8 % und dem *GPAT4*-Locus 0,9 % zugeschrieben. Für Chromosom 11 konnten keine signifikanten Assoziationen identifiziert werden, dieses weist dennoch einen erkennbaren Anteil an der Varianz (3,4 %) auf. Für *GPIHBP1* wurde der Anteil an der

## 4 Ergebnisse

Tabelle 4.1: Übersicht über die signifikantesten SNP der vier QTL für das Merkmal Fettgehalt-Zuchtwert in der Holstein-Friesian-Population. Die mit \* gekennzeichneten P-Werte stammen aus der auf DGAT1 korrigierten Analyse.  $\alpha$  ist der Allelsubstitutionseffekt.

SNP	BTA	Position (bp)	MAF	$\alpha$	P-Wert	Kandidatengen
Hapmap49734-BTA-74577	5	94.570.828	A (0,09)	-0,11	$2,00 \times 10^{-13}$	<i>EPS8</i>
ARS-BFGL-NGS-4939	14	1.801.116	G (0,31)	-0,29	$1,57 \times 10^{-198}$	<i>DGAT1</i>
BTA-84181-no-rs	20	31.552.475	G (0,37)	0,05	$1,95 \times 10^{-6}$	<i>GHR</i>
ARS-BFGL-NGS-57448	27	36.155.097	A (0,36)	0,04	$9,83 \times 10^{-5}$	<i>GPAT4</i>
Hapmap30374-BTC-002159	14	2.468.020	A (0,46)	-0,05	$1,02 \times 10^{-8*}$	<i>GPIHBP1</i>
BTA-35941-no-rs	14	2.276.443	C (0,44)	-0,05	$1,03 \times 10^{-8*}$	<i>GPIHBP1</i>
Hapmap30086-BTC-002066	14	2.524.432	G (0,47)	0,05	$4,76 \times 10^{-8*}$	<i>GPIHBP1</i>
ARS-BFGL-NGS-12338	14	71.184.631	A (0,04)	0,09	$9,66 \times 10^{-8*}$	–
BTA-35387-no-rs	14	69.965.123	A (0,05)	0,09	$2,54 \times 10^{-7*}$	–

Zuchtwert-Varianz über  $2p(1-p)\alpha^2$  berechnet. Der signifikanteste SNP Hapmap30374-BTC-002159 erklärt 1,2 %, der SNP Hapmap30086-BTC-002066 erklärt 1,1 % der Varianz.

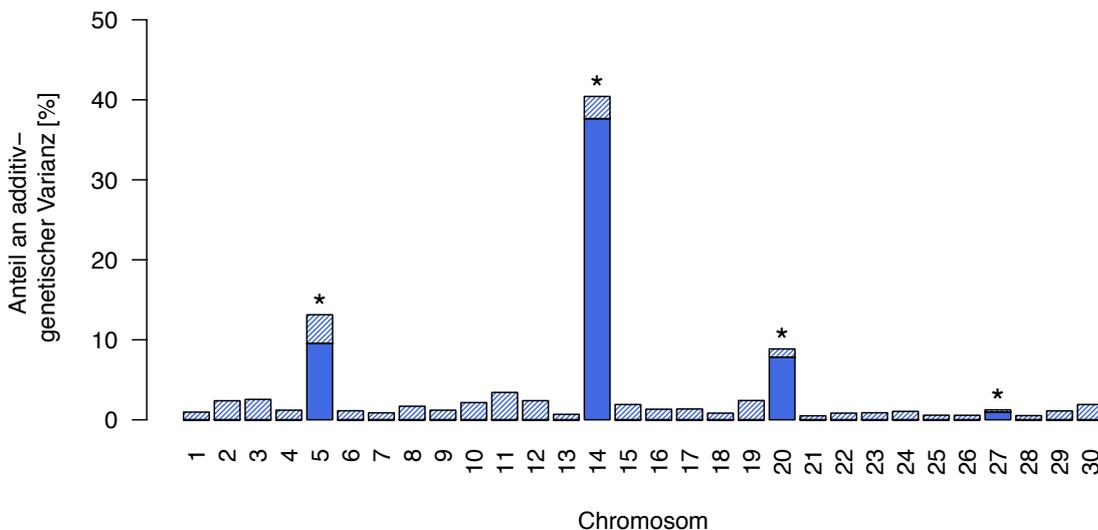


Abbildung 4.2: Aufteilung der additiv-genetischen Varianz des Merkmals Fettgehalt-Zuchtwert auf die 30 Chromosomen und 4 identifizierten QTL. Die schraffierten Balken entsprechen dem Anteil der Varianz der durch die einzelnen Chromosomen erklärt wird. Die blauen Balken stellen den Anteil der Varianz dar, der den identifizierten QTL auf BTA5, 14, 20 und 27 zugewiesen werden konnte. Auf den mit \* gekennzeichneten Chromosomen wurden in der GWAS signifikante Assoziationen identifiziert.

### 4.1.1.2 Fettgehalt-Zuchtwert der Laktationstage 10 bis 20

Für das Merkmal FPro10-20 wurden in der GWAS zunächst zwei hoch signifikant assoziierte QTL auf den Chromosomen 14 ( $P=4,59 \times 10^{-104}$ ) und 27 ( $P=1,19 \times 10^{-19}$ ) identifiziert

(Abbildung 4.3 a). Die assoziierte Region auf BTA14 wird von 33 signifikanten SNP zwischen 1,46 und 4,36 Mb eingegrenzt und deutet auf das Kandidatengen *DGAT1* hin. Der signifikanteste Marker ARS-BFGL-NGS-4939 liegt bei 1.801.116 bp und ist damit 1149 bp vom nicht-synonymen Austausch K232A (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002) entfernt. Dieser Marker ist auch in der GWAS mit dem Merkmal FPro-ZW der signifikanteste SNP auf BTA14 (siehe 4.1.1.1).

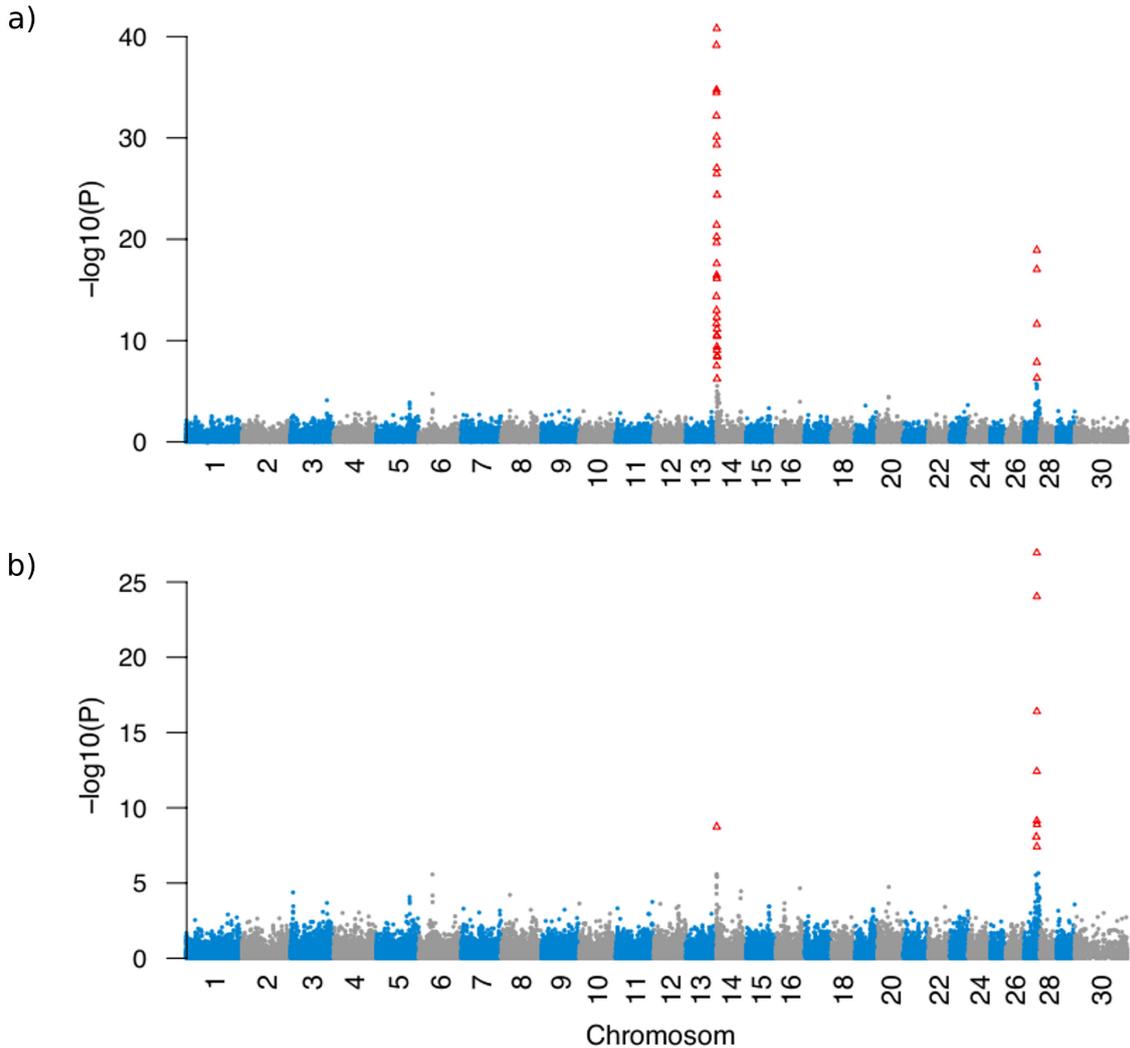


Abbildung 4.3: Manhattan-Plot der Ergebnisse aus der GWAS für das Merkmal Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20 a) vor und b) nach der Korrektur auf die K232A-Substitution in *DGAT1*. Die physikalische Position nach dem UMD3.1-Assembly ist auf der x-Achse, der negative dekadische Logarithmus der P-Werte auf der y-Achse aufgetragen. Rote Dreiecke entsprechen SNP mit  $P < 1,13 \times 10^{-6}$  (Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze). Das Signal auf BTA14 bei a) ist nicht vollständig dargestellt. Der signifikanteste SNP auf BTA14 weist einen Wert von  $P = 4,59 \times 10^{-104}$  auf.

Um Assoziationen die aufgrund des hohen Kopplungsungleichgewichts mit der K232A-Substitution in *DGAT1* auftreten auszuschließen, wurde eine weitere Analyse unter Einbezie-

hung dieser Variante durchgeführt. Durch die Korrektur auf den *DGAT1*-Polymorphismus konnte, wie für das Merkmal FPro-ZW, ein weiterer QTL auf BTA14 (bei 2,52 Mb) identifiziert werden (Abbildung 4.3 b). Der am signifikantesten assoziierte Marker Hapmap30086-BTC-00206 ( $P=1,84 \times 10^{-9}$ , Position 2.524.432 bp) ist 27,7 kb in 3'-Richtung vom Translationsstart des *GPIHBP1*-Gens entfernt.

Insgesamt sechs SNP in einem 1,53 Mb umfassenden Bereich (34,9 bis 36,4 Mb) grenzen die assoziierte Region auf BTA27 ein. Wie auch bei dem Merkmal FPro-ZW (siehe 4.1.1.1), ist der am signifikantesten assoziierte Marker der SNP ARS-BFGL-NGS-57448 ( $P=1,19 \times 10^{-19}$ ). Als funktionelles und positionelles Kandidatengen wurde *GPAT4* identifiziert.

Die SNP der GWAS, die das genomweite Signifikanzniveau von  $P=1,13 \times 10^{-6}$  erfüllen, sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Übersicht über die SNP auf den Chromosomen BTA14 und BTA27, die am signifikantesten mit dem Merkmal Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20 assoziiert sind. Der mit \* gekennzeichnete P-Wert stammt aus der auf die K232A-Substitution in *DGAT1* korrigierten Analyse.  $\alpha$  ist der Allelsubstitutionseffekt.

SNP	BTA	Position (bp)	MAF	$\alpha$	P-Wert	Kandidatengen
ARS-BFGL-NGS-4939	14	1.801.116	G (0,31)	-0,16	$4,59 \times 10^{-104}$	<i>DGAT1</i>
ARS-BFGL-NGS-57448	27	36.155.097	A (0,36)	0,07	$1,19 \times 10^{-19}$	<i>GPAT4</i>
Hapmap30086-BTC-002066	14	2.524.432	G (0,47)	0,04	$1,84 \times 10^{-9*}$	<i>GPIHBP1</i>

### Anteil der QTL an der additiv-genetischen Varianz

Die 44.280 analysierten SNP erklären insgesamt 80,7 % der Zuchtwert-Varianz des Merkmals FPro10-20. Der größte Anteil der additiv-genetischen Varianz entfällt auf die Chromosomen 14 und 27 (21,9 % bzw. 6,7 %) (Abbildung 4.4, Tabelle 9.8). Für BTA14 konnten 19,3 % der Region um das *DGAT1*-Gen zugeordnet werden. Auf BTA27 erklärt der *GPAT4*-Locus 4,7 % der additiv-genetischen Varianz. Auch die Chromosomen 3, 5 und 20 weisen einen nennenswerten Anteil an der Varianz (>4 %) auf, obwohl für diese kein signifikant assoziierter QTL in der GWAS detektiert wurde. Für diese Chromosomen sind QTL bekannt, die mit Merkmalen der Milchleistung assoziiert sind (VITALA ET AL. 2006; HAYES ET AL. 2010; COHEN-ZINDER ET AL. 2011). Der SNP Hapmap30086-BTC-002066, der nach der Korrektur auf die *DGAT1*-Variante die stärkste Assoziation zeigt, erklärt 1,9 % der Zuchtwert-Varianz.

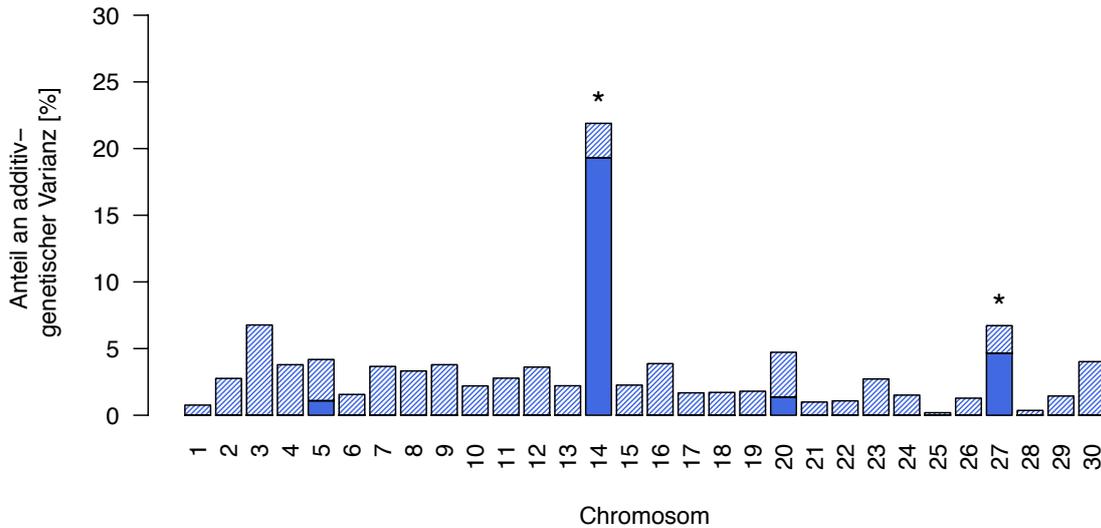


Abbildung 4.4: Aufteilung der additiv-genetischen Varianz des Merkmals Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20 auf die 30 Chromosomen und vier für den FPro-ZW identifizierte QTL. Die schraffierten Balken entsprechen dem Anteil der Varianz der einzelnen Chromosomen. Die blauen Balken stellen den Anteil der Varianz dar, der den identifizierten QTL auf BTA5, 14, 20 und 27 zugewiesen wurde. Auf den mit \* gekennzeichneten Chromosomen wurden in der GWAS signifikante Assoziationen identifiziert.

#### 4.1.1.3 Fett-Protein-Verhältnis der Laktationstage 10 bis 20

Bei der Analyse des Merkmals FPR10-20 konnten zwei QTL auf den Chromosomen 14 und 27 identifiziert werden (Abbildung 4.5 a). Die den QTL zugrunde liegenden funktionellen und positionellen Kandidatengene sind *DGAT1* und *GPAT4*. Der auf BTA14 am signifikantesten assoziierte Marker ist der SNP ARS-BFGL-NGS-4939 ( $P=1,95 \times 10^{-70}$ ). Dieser Marker weist auch bei den Merkmalen FPro-ZW und FPro10-20 die höchste Assoziation auf. Die Korrektur auf die K232A-Substitution in *DGAT1* ergab einen weiteren QTL auf BTA14, der das Kandidatengene *GPIHBP1* beinhaltet (Abbildung 4.5 b). Topmarker ist, wie bei den Fettgehalt-Merkmalen, der Polymorphismus Hapmap30086-BTC-002066 mit einem P-Wert von  $P=8,02 \times 10^{-8}$ . Der SNP ARS-BFGL-NGS-57448 ist auf BTA27 mit einem P-Wert von  $P=2,98 \times 10^{-18}$  am signifikantesten mit dem FPR der frühen Laktation assoziiert (Tabelle 4.3).

#### 4.1.1.4 Vergleich der GWAS der Merkmale FPro-ZW, FPro10-20 und FPR10-20

Für die Merkmale FPro10-20 und FPR10-20 wurden dieselben QTL mit vergleichbar starken Assoziationen identifiziert. Diese Merkmale sind mit  $r^2=0,99$  sehr stark korreliert. Die das *DGAT1*-Gen beinhaltende QTL auf BTA14 weist für den FPro-ZW mit  $P=8,91 \times 10^{-198}$  einen deutlich niedrigeren P-Wert als für das Merkmal FPro10-20 ( $P=4,59 \times 10^{-104}$ ) auf. Bei

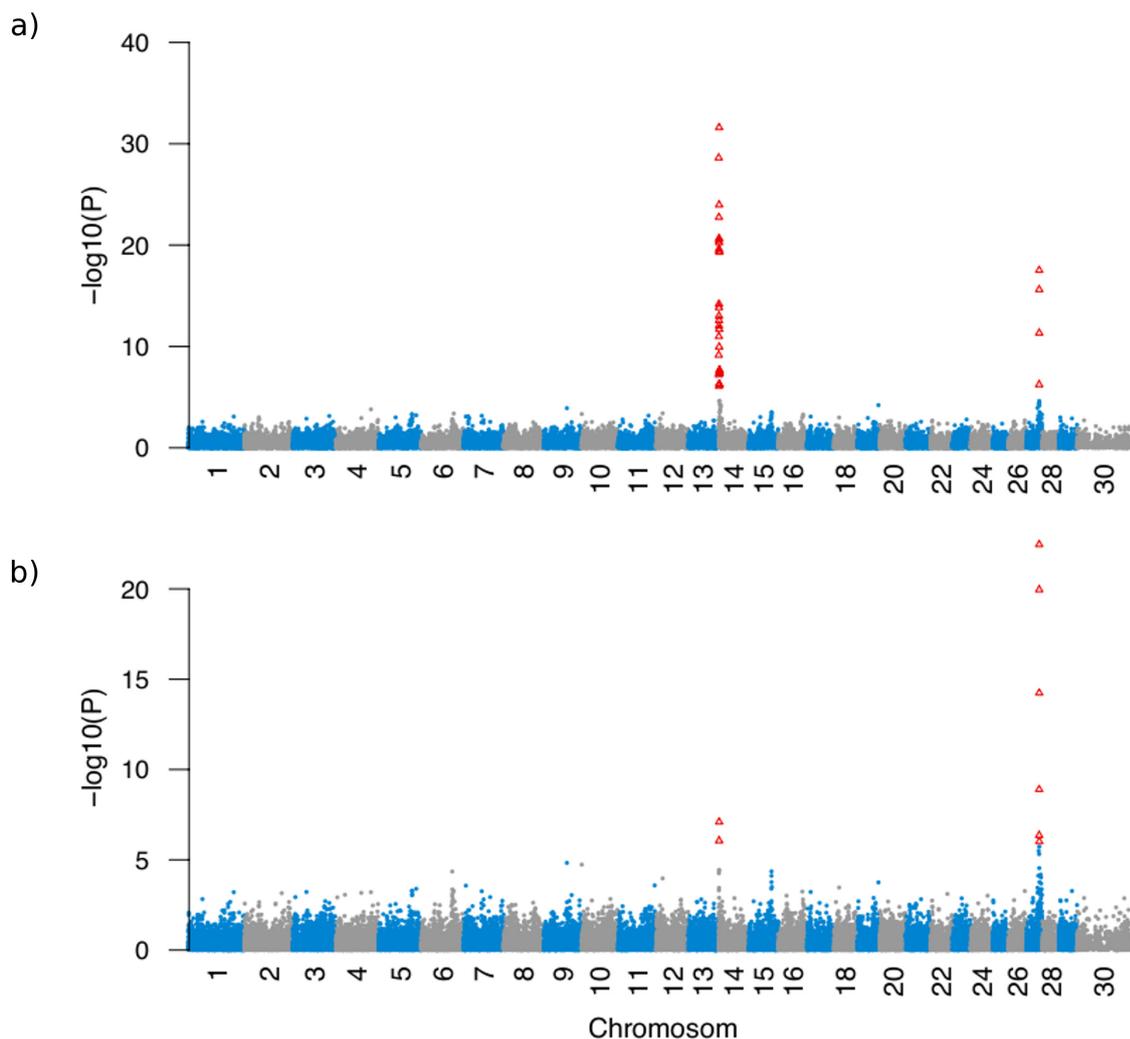


Abbildung 4.5: Manhattan-Plot der Ergebnisse aus der GWAS für das Merkmal Fett-Protein-Verhältnis der Laktationstage 10 bis 20 a) vor und b) nach der Korrektur auf die K232A-Substitution in DGAT1. Die physikalische Position nach dem UMD3.1-Assembly ist auf der x-Achse, der negative dekadische Logarithmus der P-Werte auf der y-Achse aufgetragen. Rote Dreiecke entsprechen SNP mit  $P < 1,13 \times 10^{-6}$  (Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze). Das Signal auf BTA14 bei a) ist nicht vollständig dargestellt. Der signifikanteste SNP auf BTA14 weist einen Wert von  $P = 1,95 \times 10^{-70}$  auf.

Tabelle 4.3: Übersicht über die signifikanten SNP auf den Chromosomen BTA14 und BTA27 für das Merkmal Fett-Protein-Verhältnis der Laktationstage 10 bis 20. Der mit \* gekennzeichnete P-Wert stammt aus der auf die K232A-Substitution in DGAT1 korrigierten Analyse.  $\alpha$  ist der Allelsubstitutionseffekt.

SNP	BTA	Position (bp)	MAF	$\alpha$	P-Wert	Kandidatengen
ARS-BFGL-NGS-4939	14	1.801.116	G (0,31)	-0,07	$1,95 \times 10^{-70}$	DGAT1
ARS-BFGL-NGS-57448	27	36.155.097	A (0,36)	0,03	$2,98 \times 10^{-18}$	GPAT4
Hapmap30086-BTC-002066	14	2.524.432	G (0,47)	0,02	$8,02 \times 10^{-8*}$	GPIHBP1

beiden Merkmalen ist der mit der kausalen K232A-Variante im Kopplungsungleichgewicht ( $r^2=0,998$ ) liegende Marker ARS-BFGL-NGS-4939 der am signifikantesten assoziierte SNP. Die Assoziation dieses Gens ist auch für das Merkmal FPro10-20 höchst signifikant und der Anteil der erklärten Zuchtwert-Varianz ist hoch (15,7%), so dass die Bedeutung von *DGAT1* für den Fettmetabolismus der gesamten Laktationsphase bestätigt wird (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002). Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass in der frühen Laktation der Anteil der durch BTA14 erklärten Zuchtwert-Varianz mit 17,7% niedriger als für den FPro-ZW (35,2%) ist (Tabelle 9.7 und 9.8).

Der QTL, der das *GPIHBP1*-Gen einschließt, weist bei den Merkmalen FPro-ZW und FPro10-20 vergleichbar starke Assoziationen auf. In der frühen Laktation erklärt der SNP Hapmap30086-BTC-002066 mehr Zuchtwert-Varianz (1,9%) als für den FPro-ZW (1,1%).

Die QTL auf BTA5 mit dem Kandidatengen *EPS8* und BTA20 mit der kausalen F279Y-Substitution im *GHR*-Gen zeigen bei den Merkmalen FPro10-20 und FPR10-20 keine signifikanten Assoziationen. Dennoch konnte diesen Chromosomen ein nennenswerter Anteil (>3%) an der Zuchtwert-Varianz zugewiesen werden. Diese Gene stellen über den gesamten Laktationsverlauf wichtige QTL mit deutlichen Merkmalseffekten dar. Speziell in der frühen Laktation spielen diese jedoch eine untergeordnete Rolle.

Die Region um das Kandidatengen *GPAT4* hingegen zeigt eine deutlich signifikantere Assoziation mit dem Merkmal FPro10-20 ( $P=1,19 \times 10^{-19}$ ) als mit dem FPro-ZW ( $P=9,83 \times 10^{-5}$ ), wo über die gesamte Laktation hinweg nur eine auf chromosomaler Ebene signifikante Assoziation festgestellt werden konnte. Der Anteil an erklärter Zuchtwert-Varianz ist für den FPro10-20 mit 5,4% deutlich höher als für den FPro-ZW mit 1,1%. *GPAT4* stellt ein wichtiges Kandidatengen dar, das in Fettsynthese-Prozesse der frühen Laktation involviert ist (BIONAZ & LOOR 2008b).

### 4.1.2 Genomweite Assoziationsstudien bei Fleckvieh

Nach der Qualitätskontrolle und Imputation standen Genotypen von 3643 FV-Bullen und 658.385 SNP für die GWAS zur Verfügung. Als Signifikanzgrenze wurde ein P-Wert von  $P=7,59 \times 10^{-8}$  (Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze) angenommen.

#### 4.1.2.1 Fettgehalt-Zuchtwert

Mittels Varianz-Komponenten-basiertem Ansatz wurden in der GWAS für das Merkmal FPro-ZW fünf QTL auf den Chromosomen 5, 6, 11, 14 und 20 identifiziert (Abbildung 4.6).

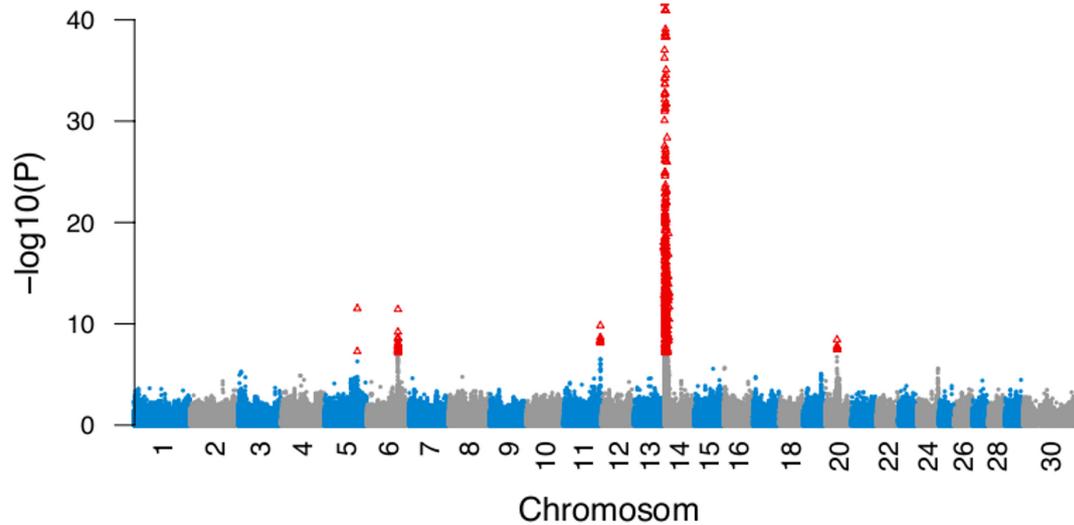


Abbildung 4.6: Manhattan-Plot der Ergebnisse aus der GWAS für das Merkmal Fettgehalt-Zuchtwert bei Fleckvieh. Die physikalische Position nach dem UMD3.1-Assembly ist auf der x-Achse, der negative dekadische Logarithmus der P-Werte auf der y-Achse aufgetragen. Rote Dreiecke entsprechen SNP mit  $P < 7,59 \times 10^{-8}$  (Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze). Das Signal auf BTA14 ist nicht vollständig dargestellt. Der signifikanteste SNP auf BTA14 weist einen Wert von  $P = 1,32 \times 10^{-196}$  auf.

Auf BTA5 ist der SNP BovineHD0500026662 am stärksten mit dem FPro-ZW assoziiert ( $P = 3,07 \times 10^{-12}$ ). Der Polymorphismus (Position 93.945.655 bp) ist 3,5 kb vom Kandidatengen *MGST1* und 608 kb von *EPS8* entfernt. Das *EPS8*-Gen wurde bereits bei HF als funktionelles Kandidatengen identifiziert (siehe 4.1.1.1). Das für die mikrosomale Glutathion-S-Transferase (*MGST1*) kodierende *MGST1* spielt primär eine wichtige Rolle im Schutz vor Lipidperoxidation (MOSIALOU ET AL. 1993) und oxidativem Stress (MAEDA ET AL. 2005).

Der auf BTA6 bei 87.180.731 bp lokalisierte SNP BovineHD4100005296 ist auf diesem Chromosom mit  $P = 3,75 \times 10^{-12}$  am signifikantesten mit dem FPro-ZW assoziiert. Insgesamt 22 Marker grenzen die Region von 87,1 bis 87,3 Mb ein und deuten auf die Casein-kodierenden Gene (*CSN*) als Kandidatengenregion hin. Der SNP BovineHD4100005296 liegt in Intron 7 des für das  $\beta$ -Casein kodierenden *CSN2*-Gens. In dieser Region konnten bereits QTL für Milchleistungsmerkmale identifiziert werden (BOVENHUIS ET AL. 1992; VELMALA ET AL. 1995).

Auf Chromosom 11 sind fünf SNP signifikant assoziiert und grenzen den QTL auf den Abschnitt bei 103,3 Mb ein. Der signifikanteste Marker ist ARS-BFGL-NGS-31097 ( $P = 1,51 \times 10^{-10}$ ) an Position 103.289.035 bp. Dieser Polymorphismus ist 12,6 kb vom Transkriptionsstart des für das Progesteron-assoziiertes-endometrisches-Protein kodierenden *PAEP*-Gens entfernt. Das für das Molkenprotein  $\beta$ -Lactoglobulin kodierende *PAEP*-Gen

wurde bereits in Zusammenhang mit Milchleistungsmerkmalen beschrieben (BERRY ET AL. 2010; YANG ET AL. 2012) und stellt ein funktionelles Kandidatengen dar.

Der QTL auf Chromosom 14 wird von 379 Markern auf die Region zwischen 1,4 und 7,3 Mb eingegrenzt. Der signifikanteste SNP auf BTA14 ist BovineHD1400000216 ( $P=1,32 \times 10^{-196}$ ). Dieser SNP liegt an Position 1.736.599 bp und ist 66 kb von der als kausal postulierten K232A-Substitution im *DGAT1*-Gen (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002) entfernt. Der bei der Rasse HF im vollständigen Kopplungsungleichgewicht mit der kausalen Variante liegende SNP ARS-BFGL-NGS-4939 ist in der GWAS bei Fleckvieh ebenfalls signifikant assoziiert ( $P=9,64 \times 10^{-120}$ ).

Der Marker BovineHD2000009150 ist auf BTA20 am signifikantesten mit dem FPro-ZW assoziiert ( $P=3,72 \times 10^{-9}$ ). Der SNP liegt an Position 31.739.030 bp, 170 kb in 3'-Richtung der als kausal postulierten F279Y-Substitution im *GHR*-Gen (BLOTT ET AL. 2003).

Die signifikantesten Polymorphismen der identifizierten QTL sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Tabelle 4.4: Übersicht über die signifikantesten SNP der fünf QTL für das Merkmal Fettgehalt-Zuchtwert in der Fleckvieh-Population.  $\alpha$  ist der Allelsubstitutionseffekt.

SNP	BTA	Position (bp)	MAF	$\alpha$	P-Wert	Kandidatengen
BovineHD0500026662	5	93.945.655	A (0,19)	0,06	$3,07 \times 10^{-12}$	<i>EPS8</i> , <i>MGST1</i>
BovineHD4100005296	6	87.180.731	C (0,35)	-0,04	$3,75 \times 10^{-12}$	<i>CSN2</i>
ARS-BFGL-NGS-31097	11	103.289.035	G (0,43)	-0,03	$1,51 \times 10^{-10}$	<i>PAEP</i>
BovineHD1400000216	14	1.736.599	A (0,08)	-0,25	$1,32 \times 10^{-196}$	<i>DGAT1</i>
BovineHD2000009150	20	31.739.030	A (0,24)	0,04	$3,72 \times 10^{-9}$	<i>GHR</i>

### Anteil der QTL an der additiv-genetischen Varianz

Die 658.385 analysierten SNP erklären insgesamt 93,4 % der Zuchtwert-Varianz. Der größte Anteil der additiv-genetischen Varianz entfällt mit Werten von 5,6 %, 51,5 % und 4,5 % auf die Chromosomen 5, 14 und 20 (Abbildung 4.7, Tabelle 9.9). Nahezu die gesamte Varianz auf BTA14 wird durch den *DGAT1*-Locus erklärt (50,6 %). QTL mit den identifizierten Kandidatengen *EPS8* bzw. *MGST1*, *CSN2*, *PAEP* und *GHR* sind mit 2,14 %, 1,66 %, 1,26 % und 2,89 % an der additiv-genetischen Varianz beteiligt.

#### 4.1.2.2 Fettgehalt-Zuchtwert der Laktationsphasen

In der GWAS mit dem Merkmal FPro über den Laktationsverlauf wurden Zuchtwerte für den FPro jedes Laktationstages der zweiten Laktation über Random-Regression-Testtagsmodelle

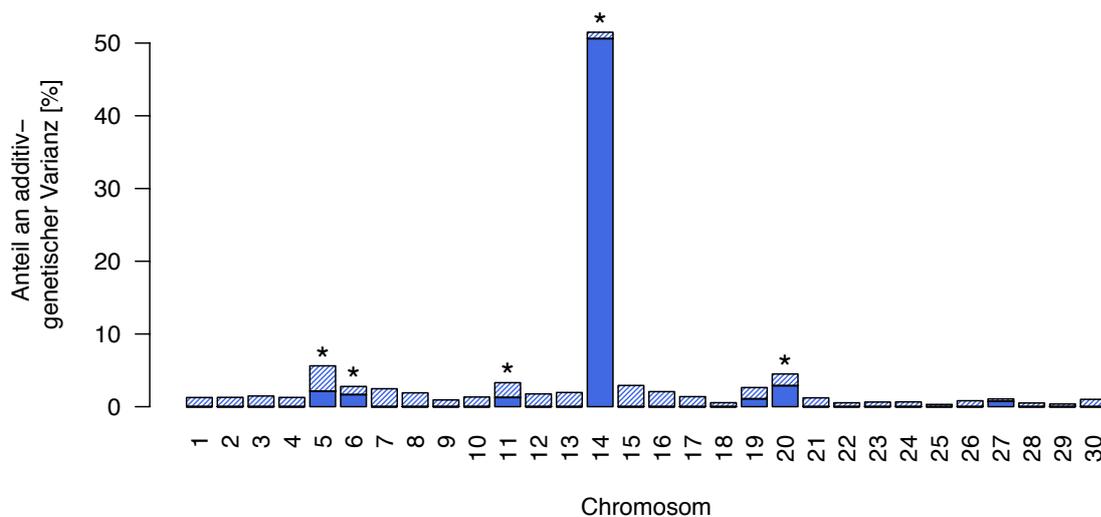


Abbildung 4.7: Aufteilung der additiv-genetischen Varianz des Merkmals Fettgehalt-Zuchtwert auf die 30 Chromosomen und sieben identifizierte QTL. Die schraffierten Balken entsprechen dem Anteil der Varianz der einzelnen Chromosomen. Die blauen Balken stellen den Anteil der Varianz dar, der den identifizierten QTL auf BTA5, 6, 11, 14, 19, 20 und 27 zugewiesen wurde. Auf den mit \* gekennzeichneten Chromosomen wurden in der GWAS signifikante Assoziationen identifiziert.

geschätzt und jeweils für fünf aufeinanderfolgende Tage aufsummiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Laktation zeigen verschiedene Genomregionen eine Assoziation mit dem untersuchten Merkmal. Es sind insgesamt acht QTL (BTA5, 6, 11, 14, 19, 20, 27 und X) signifikant assoziiert. Basierend auf dem UMD3.1-Assembly des bovinen Genoms (ZIMIN ET AL. 2009) konnten für die assoziierten Regionen positionelle Kandidatengene identifiziert werden. Für weitere Analysen wurden die Gene auf funktionelle Zusammenhänge mit dem Merkmal Milchfettgehalt überprüft.

Über die gesamte Laktation hinweg wurde die stärkste Assoziation auf BTA14 verzeichnet. Der Marker BovineHD1400000216 ist bei allen Laktationsphasen der am signifikantesten assoziierte Polymorphismus. Der SNP ist an Position 1.736.599 bp lokalisiert und liegt 66 kb von der als kausal postulierten K232A-Variante des *DGAT1*-Gens (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002) entfernt. Die niedrigsten P-Werte auf BTA14 werden an den Tagen 150 und 200 der Laktation ( $P=3,22 \times 10^{-192}$  bzw.  $P=8,41 \times 10^{-192}$ ) erreicht. Zu Beginn der Laktation (Tag 10) ist die Assoziation des QTL auf BTA14 am schwächsten ( $P=1,17 \times 10^{-47}$ ).

Der QTL auf BTA11 zeigt, ausgenommen Tag 300, über alle Laktationsphasen hinweg signifikante Assoziationen. Bis Laktationstag 25 ist der Polymorphismus BovineHD1100030066 (Position 103.302.351 bp) der signifikanteste Marker auf Chromosom 11, ab Tag 50 ist der SNP ARS-BFGL-NGS-31097 (Position 103.289.035 bp) der Topmarker. Jedoch zeigen beide Marker zu allen Zeitpunkten sehr ähnliche P-Werte. Die stärkste Assoziation wird an Tag

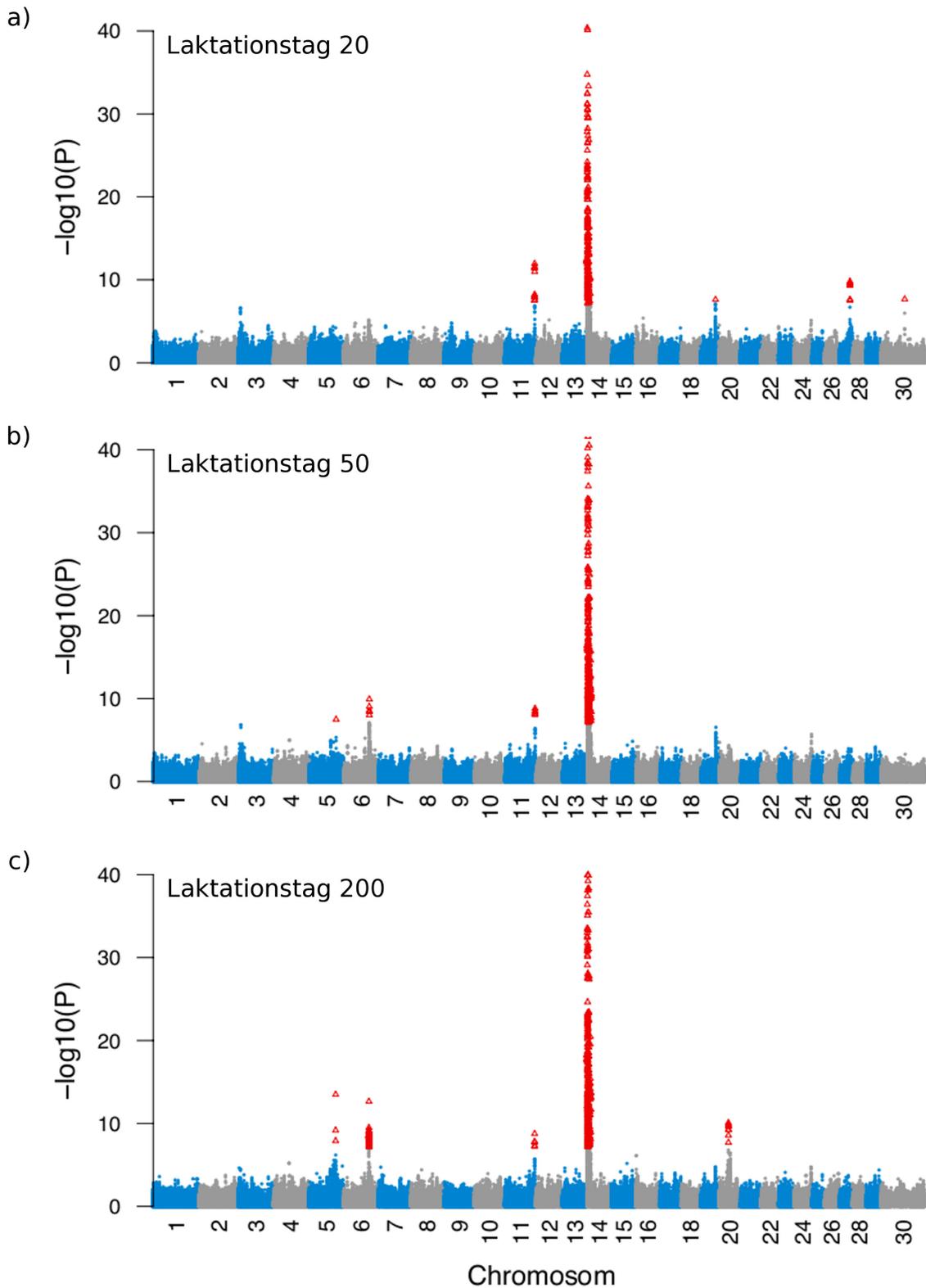


Abbildung 4.8: Manhattan-Plot der Ergebnisse aus der GWAS für das Merkmal Fettgehalt der Laktationstage a) 20, b) 50 und c) 200 bei Fleckvieh. Die physikalische Position nach dem UMD3.1-Assembly ist auf der x-Achse, der negative dekadische Logarithmus der P-Werte auf der y-Achse aufgetragen. Rote Dreiecke entsprechen SNP mit  $P < 7,59 \times 10^{-8}$  (Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze)

15 ( $P=8,76 \times 10^{-13}$ ) verzeichnet. Im Laktationsverlauf nimmt die Stärke der Signifikanz stetig ab. Die Marker sind 13,3 kb voneinander entfernt und weisen ein starkes Kopplungsungleichgewicht ( $r^2=0,76$ ) auf. Der SNP BovineHD1100030066 liegt in Intron 1 und der SNP ARS-BFGL-NGS-31097 im 5'-flankierenden Bereich, 12,6 kb vom Transkriptionsstart des *PAEP*-Gens entfernt. *PAEP* kodiert für das Molkenprotein  $\beta$ -Lactoglobulin und wurde bereits in Zusammenhang mit Milchleistungsmerkmalen beschrieben (BERRY ET AL. 2010; YANG ET AL. 2012).

Der im späteren Laktationsverlauf (ab Tag 50) auf BTA5 assoziierte SNP BovineHD500026662 (Position 93.945.655 bp) deutet auf das 3,5 kb entfernte *MGST1*-Gen und das 608 kb entfernte *EPS8*-Gen hin. Beide Gene weisen funktionelle Zusammenhänge mit dem Fettstoffwechsel auf (TOCCHETTI ET AL. 2010; LEE ET AL. 2008). Auf Chromosom 6 ist der SNP BovineHD4100005296 ab Laktationstag 50 signifikant mit dem Fettgehalt assoziiert. In dieser Region wurden bereits QTL für Milchleistungsmerkmale identifiziert (BOVENHUIS ET AL. 1992; VELMALA ET AL. 1995). Ab Laktationstag 150 konnte auf BTA20 eine signifikante Assoziation festgestellt werden. Der signifikanteste Marker BovineHD2000009150 liegt an Position 31.739.030 bp und ist 325 kb vom Transkriptionsstart des *GHR*-Gens und 152 kb in 3'-Richtung der bereits als kausal postulierten F279Y-Substitution im *GHR*-Gen (BLOTT ET AL. 2003) entfernt.

Für den Zeitraum der frühen Laktation (bis Tag 50) wurden signifikante Assoziationen auf BTA19, BTA27 und BTX gefunden. Der auf Chromosom 19 assoziierte QTL zeigt signifikante P-Werte an den Laktationstagen 15, 20 und 25. Der an Position 51.326.750 bp lokalisierte Topmarker ARS-BFGL-NGS-39328 liegt 58 kb in 5'-Richtung vom Transkriptionsstart des funktionellen Kandidatengens *FASN*. Das *FASN*-Gen kodiert für die Fettsäure-Synthase und wurde bereits in Zusammenhang mit der Fettsäurezusammensetzung von Milch beschrieben (MORRIS ET AL. 2007). Der Marker BovineHD2700010364 auf BTA27 zeigt an den Tagen 10 bis 25 signifikante Assoziationen mit dem Fettgehalt. Die höchste Signifikanz ( $P= 1,52 \times 10^{-12}$ ) wurde an Laktationstag 10 festgestellt. Der SNP (Position 36.271.313 bp) ist 59 kb in 3'-Richtung vom Translationsstart des funktionellen Kandidatengens *GPAT4* lokalisiert. Für den mit dem Fettgehalt der frühen Laktationsphase (Tag 10 bis 20) assoziierten QTL auf dem X-Chromosom konnte kein funktionelles Kandidatengen identifiziert werden. Der signifikanteste Marker ist BovineHD3000022646 an Position 81.797.691 bp mit einem P-Wert von  $P=1,41 \times 10^{-9}$ .

Die den assoziierten Regionen zugrunde liegenden positionellen und funktionellen Kandidatengene sind in Tabelle 4.5 mit den P-Werten der einzelnen Laktationsphasen zusammengefasst.

### **Anteil der Chromosomen und QTL an der Varianz**

Betrachtet man die einzelnen Testtage des Laktationsverlaufs, so stellt sich der Anteil der durch die einzelnen Chromosomen erklärten Zuchtwert-Varianz des Merkmals Fettgehalt variabel dar (Abbildung 4.9). Den Chromosomen 5, 6, 14 und 20 wird in der frühen Laktation weniger Varianz zugeschrieben als im späteren Laktationsverlauf. BTA11 und BTA27 weisen vor allem in der frühen Laktation einen beachtlichen Anteil an der Zuchtwert-Varianz auf, nach Tag 30 ist die erklärte Varianz mit 4 % bzw. 2 % gering. Das Chromosom 19 zeigt über den gesamten Zeitraum gleichbleibende Werte. Besonders deutlich werden diese Laktationsphasen-bedingten Unterschiede bei Betrachtung der Anteile an der additiv-genetischen Varianz an den Laktationstagen 20 und 200 (Abbildung 4.10).

Tabelle 4.5: Signifikante SNP der QTL der einzelnen Laktationstage. P-Werte mit  $P > 7,59 \times 10^{-8}$  sind als nicht-signifikant (n.s.) gekennzeichnet.

SNP	BTA	Position (bp)	Kandidatengen	P-Wert						
				Tag 10	Tag 15	Tag 20	Tag 25	Tag 50	Tag 100	
BovineHD500026662	5	93.945.655	EPSS/MGST1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$3,26 \times 10^{-8}$	$1,07 \times 10^{-10}$
BovineHD4100005296	6	87.180.731	CSN2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$1,17 \times 10^{-10}$	$1,81 \times 10^{-12}$
BovineHD1100030066	11	103.302.351	PAEP	$4,07 \times 10^{-12}$	$8,76 \times 10^{-13}$	$1,41 \times 10^{-12}$	$3,97 \times 10^{-12}$	$3,14 \times 10^{-9}$	$1,07 \times 10^{-8}$	$1,07 \times 10^{-8}$
ARS-BFGL-NGS-31097	11	103.289.035	PAEP	$2,78 \times 10^{-11}$	$4,00 \times 10^{-12}$	$3,26 \times 10^{-12}$	$7,31 \times 10^{-12}$	$1,55 \times 10^{-9}$	$2,53 \times 10^{-9}$	$2,53 \times 10^{-9}$
BovineHD140000216	14	1.736.599	DGAT1	$1,17 \times 10^{-47}$	$5,40 \times 10^{-76}$	$7,67 \times 10^{-102}$	$4,24 \times 10^{-122}$	$2,74 \times 10^{-167}$	$4,92 \times 10^{-185}$	$4,92 \times 10^{-185}$
ARS-BFGL-NGS-39328	19	51.326.750	FASN	n.s.	$6,56 \times 10^{-8}$	$2,46 \times 10^{-8}$	$2,07 \times 10^{-8}$	n.s.	n.s.	n.s.
BovineHD200009150	20	31.739.030	GHR	n.s.						
BovineHD2700010364	27	36.271.313	GPAT4	$1,52 \times 10^{-12}$	$8,48 \times 10^{-12}$	$1,65 \times 10^{-10}$	$4,01 \times 10^{-9}$	n.s.	n.s.	n.s.
BovineHD3000022646	X	81.797.691	-	$1,41 \times 10^{-9}$	$3,21 \times 10^{-9}$	$2,19 \times 10^{-8}$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
				Tag 150	Tag 200	Tag 250	Tag 300			
BovineHD500026662	5	93.945.655	EPSS/MGST1	$1,17 \times 10^{-12}$	$3,25 \times 10^{-14}$	$2,71 \times 10^{-15}$	$1,82 \times 10^{-15}$			
BovineHD4100005296	6	87.180.731	CSN2	$3,87 \times 10^{-13}$	$2,25 \times 10^{-13}$	$3,30 \times 10^{-13}$	$2,26 \times 10^{-12}$			
BovineHD1100030066	11	103.302.351	PAEP	$7,71 \times 10^{-9}$	$1,61 \times 10^{-8}$	$1,41 \times 10^{-7}$	n.s.			
ARS-BFGL-NGS-31097	11	103.289.035	PAEP	$1,13 \times 10^{-9}$	$1,76 \times 10^{-9}$	$1,43 \times 10^{-8}$	n.s.			
BovineHD140000216	14	1.736.599	DGAT1	$3,22 \times 10^{-192}$	$8,41 \times 10^{-192}$	$2,01 \times 10^{-183}$	$7,81 \times 10^{-163}$			
ARS-BFGL-NGS-39328	19	51.326.750	FASN	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
BovineHD200009150	20	31.739.030	GHR	$2,75 \times 10^{-9}$	$8,50 \times 10^{-11}$	$1,49 \times 10^{-11}$	$3,69 \times 10^{-11}$			
BovineHD2700010364	27	36.271.313	GPAT4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
BovineHD3000022646	X	81.797.691	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			

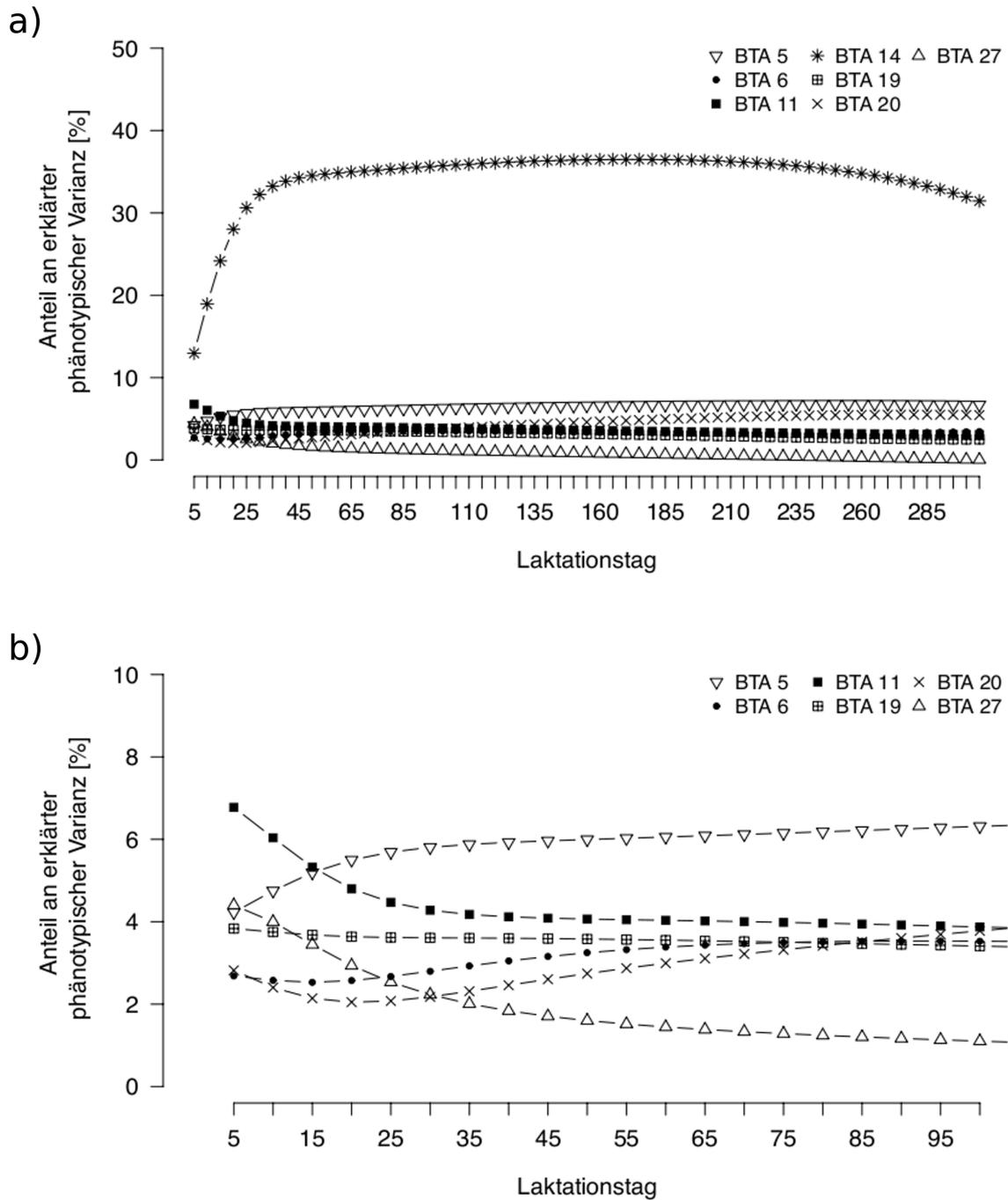


Abbildung 4.9: Erklärte Zuchtwert-Varianz a) der Chromosomen 5, 6, 11, 14, 19, 20 und 27 mit signifikant assoziierten QTL für das Merkmal Fettgehalt bei FV über den gesamten Laktationsverlauf und b) der Chromosomen 5, 6, 11, 19, 20 und 27 für die Laktationstage 1 bis 100.

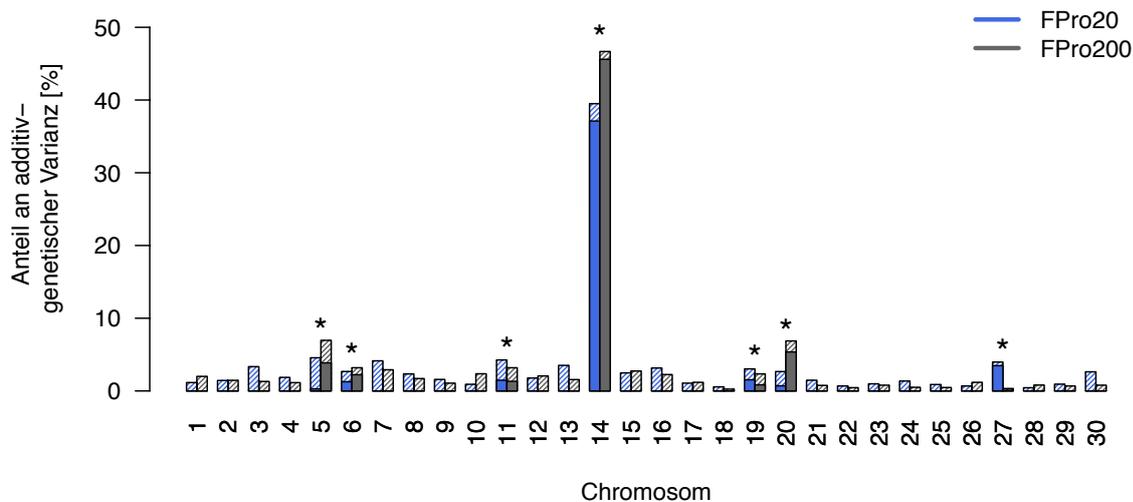


Abbildung 4.10: Aufteilung der additiv-genetischen Varianz der Merkmale FPro20 und FPro200 auf die 30 Chromosomen und sieben identifizierten QTL. Die schraffierten Balken entsprechen dem Anteil der additiv-genetischen Varianz der einzelnen Chromosomen. Die blauen und grauen Balken stellen den Anteil der Varianz dar, der den identifizierten QTL auf BTA5, 6, 11, 14, 19, 20 und 27 zugewiesen wurde. Auf den mit \* gekennzeichneten Chromosomen wurden in der GWAS signifikante Assoziationen identifiziert.

### 4.1.3 Vergleich der GWAS der Rassen Holstein-Friesian und Fleckvieh

Der QTL auf BTA20 mit dem Kandidatengen *GHR* ist bei HF mit dem Merkmal FPro-ZW assoziiert und wurde auch bei der Rasse FV für den FPro-ZW und den Fettgehalt im späteren Laktationsverlauf (ab Tag 150) identifiziert. In der frühen Laktation konnten bei beiden Rassen keine Assoziationen festgestellt werden. Das Chromosom BTA20 erklärte jedoch auch in der frühen Laktationsphase einen erkennbaren Anteil an der Zuchtwert-Varianz. Als signifikantester SNP bei HF wurde BTA-84181-no-rs mit einer Entfernung von 357 kb zur vermuteten kausalen F279Y-Substitution (BLOTT ET AL. 2003) identifiziert. Der Topmarker bei der Rasse FV ist BovineHD2000009150 mit einer geringeren Distanz von 170 kb zum Polymorphismus F279Y.

Der auf BTA5 lokalisierte QTL zeigt ein ähnliches Bild wie der QTL auf BTA20. Signifikante Assoziationen konnten bei FV erst im späteren Verlauf der Laktation (ab Tag 50) nachgewiesen werden. Die Position der signifikantesten Marker zeigt jedoch Unterschiede. Bei HF ist der Topmarker Hapmap49734-BTA-74577 im zweiten Intron des Kandidatengens *EPS8* lokalisiert, während die Distanz des bei FV identifizierten Topmarkers BovineHD500026662 608 kb zu *EPS8* beträgt und positionell primär auf das 3,5 kb entfernte Kandidatengen *MGST1* hindeutet.

Die bei FV im Verlauf der Laktation als signifikant assoziiert beschriebenen QTL auf BTA6 (*CSN2*), BTA11 (*PAEP*) und BTA19 (*FASN*) konnten bei HF nicht festgestellt werden.

Das Kandidatengen *DGAT1* weist bei beiden untersuchten Rassen und allen Fettmerkmalen die signifikantesten Assoziationen auf. Die Identifizierung des *DGAT1*-Locus bei den verschiedenen Rassen erfolgte jedoch über unterschiedliche Marker. Bei HF liegt der Topmarker mit 1149 bp Entfernung sehr nah an der kausalen Variante K232A (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002), während bei FV die Distanz 66 kb beträgt. Diese Unterschiede sind auf die unterschiedlichen Haplotypen-Strukturen zurückzuführen. Bei FV existieren mehrere Haplotypen die das A-Allel der kausalen Substitution tragen (WINTER ET AL. 2002). Dies hat zudem zur Folge, dass hier keine Korrektur auf *DGAT1* durchgeführt werden konnte. Der zweite QTL der bei HF auf BTA14 identifiziert wurde und das Kandidatengen *GPIHBP1* beinhaltet, konnte daher nicht bei der Rasse FV validiert werden.

*GPAT4* auf BTA27 konnte bei beiden Rassen mit dem Fettgehalt in der frühen Laktation in Verbindung gebracht werden. Der Anteil der von BTA27 erklärten Zuchtwert-Varianz, ist bei den Rassen HF und FV zu Beginn der Laktation höher, als für die ganze Laktation bzw. im späteren Verlauf der Laktation. Bei HF ist der signifikanteste Marker ARS-BFGL-NGS-57448 56 kb vom Kandidatengen *GPAT4* entfernt. Bei der Rasse FV konnte für den Fettgehalt der frühen Laktation (bis Tag 50) der SNP BovineHD2700010364 als am signifikantesten assoziiert identifiziert werden. Dieser SNP liegt 59 kb vom Transkriptionsstart von *GPAT4* entfernt.

### 4.1.4 Funktionale und genomische Charakterisierung der Kandidatengene

#### 4.1.4.1 QTL auf BTA5 und die Kandidatengene *EPS8* und *MGST1*

Sowohl für das Merkmal FPro-ZW bei den Rassen HF und FV, als auch für den Fettgehalt ab Laktationstag 50 bei FV wurde ein signifikant assoziierter QTL auf BTA5 im Bereich des *EPS8*- und des *MGST1*-Gens identifiziert (Abbildung 4.11 a und 4.11 b).

Das durch *EPS8* kodierte Protein Epidermal-Growth-Factor-Receptor-Pathway-Substrat-8 ist an der Interaktion und am Umbau von Aktin beteiligt. TOCCHETTI ET AL. (2010) konnten in Studien an Mausmodellen zeigen, dass *EPS8* einen Effekt auf das Aufnahmevermögen des Darms hat. Die Energieaufnahme von *EPS8*<sup>-/-</sup> Mäusen war selbst bei erhöhter Nahrungsaufnahme gering. Die Folge waren ein niedriger Körperfettanteil und eine geringere Sensitivität gegenüber Insulin, sowie ein veränderter Glucosespiegel im Blut. Des Weiteren ist *EPS8* wichtiger Bestandteil des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

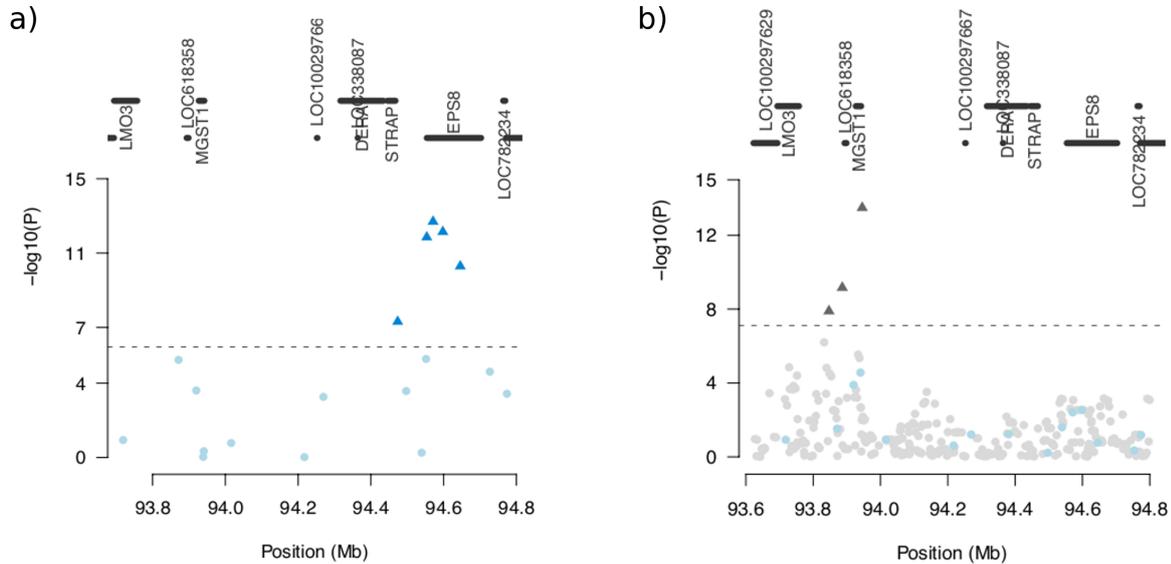


Abbildung 4.11: BTA5 (93,4 - 94,6 Mb) mit den positionellen Kandidatengenen am assoziierten QTL für die Merkmale a) Fettgehalt-Zuchtwerth bei HF und b) Fettgehalt Laktationstag 200 bei FV. Signifikant assoziierte Marker a)  $P < 1,13 \times 10^{-6}$  und b)  $P < 7,59 \times 10^{-8}$  sind als Dreiecke dargestellt. In Abbildung b) stellen blaue Symbole SNP aus der Genotypisierung mit dem Illumina BovineSNP50 BeadChip, graue Symbole SNP des Illumina BovineHD BeadChips dar.

Stoffwechselweges (FAZIOLI ET AL. 1993). CHATTERJEE ET AL. (2009) konnten nachweisen, dass EGFR in die Regulation von Sterol-Regulatory-Element-Binding-Proteinen (SREBP) involviert ist. SREBP kontrollieren die Expression von Genen des Fettsäure- und Triglyceridmetabolismus (RUDOLPH ET AL. 2010) und sind damit Schlüsselemente der Milchfettsynthese (BIONAZ & LOOR 2008b).

Das für die mikrosomale Glutathion-S-Transferase kodierende *MGST1* spielt primär eine wichtige Rolle im Schutz vor Lipidperoxidation (MOSIALOU ET AL. 1993) und oxidativem Stress (MAEDA ET AL. 2005). Ein funktioneller Zusammenhang zum Milchfettgehalt könnte sich über die Reaktion von *MGST1* auf Lipopolysaccharide (LPS) ergeben. In Studien an Ratten wurde die Aktivität von *MGST1* durch die Verabreichung von LPS signifikant erhöht (LEE ET AL. 2008). ZEBELI & AMETAJ (2009) konnten eine negative Korrelation zwischen LPS und dem Fettgehalt der Milch nachweisen. Lipopolysaccharide werden in Zusammenhang mit dem Auftreten von Milchfettdepression und der ernährungsbedingten Veränderung der Pansenflora diskutiert (GOZHO ET AL. 2007). Zusätzlich kann durch LPS eine suppressive Wirkung auf wichtige Enzyme des Fettstoffwechsels, wie FASN und LPL hervorgerufen werden (PEKALA ET AL. 1983; KHOVIDHUNKIT 2004), wodurch sich Auswirkungen auf den Milchfettgehalt ergeben.

Auf Chromosom BTA5 konnte bereits in anderen Studien ein QTL für das Merkmal

Fettgehalt identifiziert werden (HAYES ET AL. 2010; WANG ET AL. 2012). Da dieser QTL keine Assoziationen mit dem Fettgehalt der frühen Laktation zeigte, wurden die identifizierten Kandidatengene *EPS8* und *MGST1* nicht eingehender analysiert.

#### 4.1.4.2 QTL auf BTA6 und die Kandidatengene des *CSN*-Clusters

Bei der Rasse FV konnte für den FPro-ZW und für den Fettgehalt ab Laktationstag 50 eine signifikante Assoziation auf BTA6 im Bereich der *CSN*-Gene und insbesondere bei *CSN2* festgestellt werden (Abbildung 4.12).

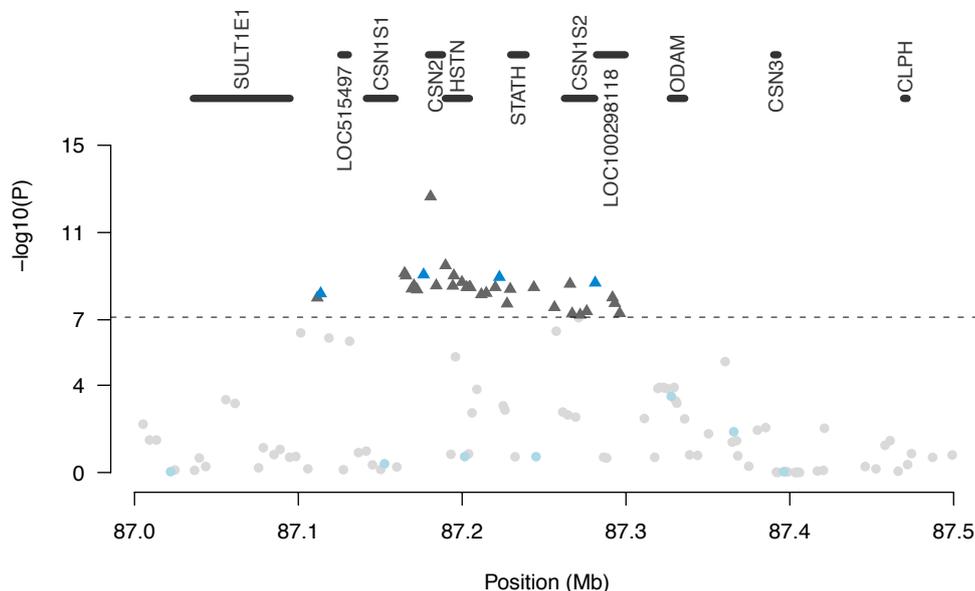


Abbildung 4.12: BTA6 (87,0 - 87,5 Mb) mit den positionellen Kandidatengenen am assoziierten QTL für das Merkmal Fettgehalt Laktationstag 200 bei FV. Signifikant assoziierte Marker ( $P < 7,59 \times 10^{-8}$ ) sind als Dreiecke dargestellt. Blaue Symbole repräsentieren SNP aus der Genotypisierung mit dem Illumina BovineSNP50 BeadChip, graue Symbole stellen SNP des Illumina BovineHD BeadChips dar.

Auf BTA6 sind bislang verschiedene QTL für Milchleistungsmerkmale identifiziert und beschrieben worden (GEORGES ET AL. 1995; COHEN-ZINDER ET AL. 2005; WEIKARD ET AL. 2012). Einer dieser Loci liegt im Bereich der für die Casein-Varianten kodierenden Gene *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* und *CSN3*. Diese Region zeigte in verschiedenen Rassen Assoziationen mit der Milchmenge und mit Proteinmerkmalen (BOVENHUIS ET AL. 1992; VELMALA ET AL. 1995). Die von 87,1 bis 87,4 Mb lokalisierten *CSN*-Gene kodieren für  $\alpha$ -S1-,  $\beta$ -,  $\alpha$ -S2- und  $\kappa$ -Casein. Es wurden verschiedene Haplotypen beschrieben, die sich auf die Caseinzusammensetzung und auch auf den Proteingehalt auswirken (VELMALA ET AL. 1995). Zusätzlich zeigte dieser Locus in Studien Auswirkungen auf die Fettmenge und den Fettgehalt der Milch (BOVENHUIS ET AL. 1992; VELMALA ET AL. 1995; MAI

ET AL. 2010; IKONEN ET AL. 2001). Ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen den *CSN*-Genen und dem Fettgehalt konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

Der signifikanteste Marker aus der GWAS BovineHD4100005296 (Position 87.180.731 bp) ist in Intron 7 des *CSN2*-Gens lokalisiert. Da dieser QTL keine Assoziationen mit dem FPro der frühen Laktation zeigte, wurden die Kandidatengene und insbesondere das *CSN2*-Gen auf BTA6 nicht eingehender untersucht.

### 4.1.4.3 QTL auf BTA11 und das Kandidatengen *PAEP*

Für den FPro der Laktationstage 10 bis 250 konnten bei der Rasse FV signifikante Assoziationen auf BTA11 identifiziert werden (Abbildung 4.13). Der QTL weist auf das Kandidatengen *PAEP* hin.

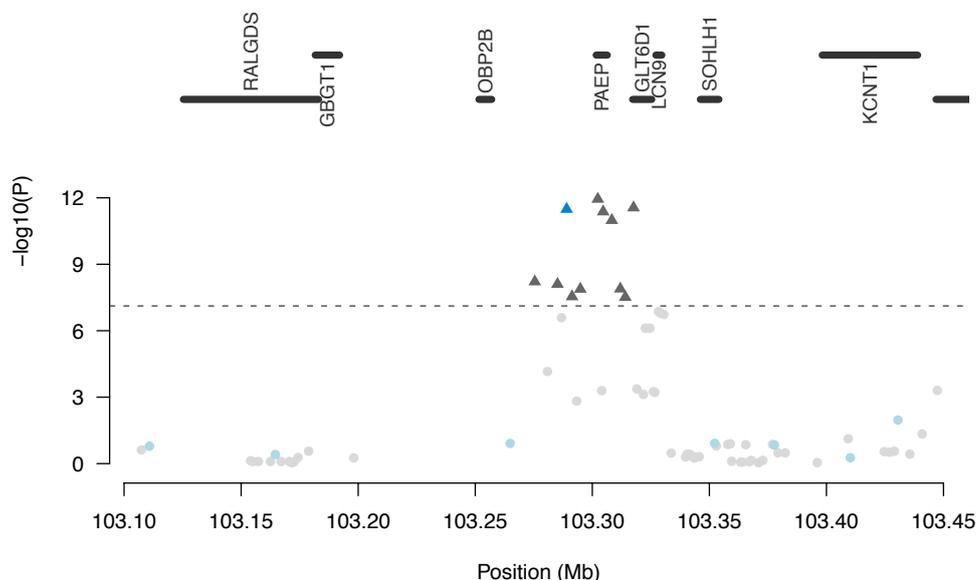


Abbildung 4.13: BTA11 (103,1 - 103,5 Mb) mit den positionellen Kandidatengenen am assoziierten QTL für das Merkmal Fettgehalt Laktationstag 20 bei FV. Signifikant assoziierte Marker ( $P < 7,59 \times 10^{-8}$ ) sind als Dreiecke dargestellt. Blaue Symbole repräsentieren SNP aus der Genotypisierung mit dem Illumina BovineSNP50 BeadChip, graue Symbole stellen SNP des Illumina BovineHD BeadChips dar.

### Funktionelle Charakterisierung von *PAEP*

*PAEP* kodiert für das Progesteron-assoziierte endometrische Protein, das auch als  $\beta$ -Lactoglobulin bezeichnet wird. Das Gen wurde beim Rind auf BTA11 kartiert (HAYES & PETIT 1993). Während  $\beta$ -Lactoglobulin bei Mensch und Maus nicht nachweislich synthetisiert wird, stellt es bei Wiederkäuern neben den Casein-Varianten eines der wichtigsten Proteine in der Milch dar (MARTIN ET AL. 2002). Die Regulation von Milchprotein-Genen erfolgt in der Regel über komplexe Prozesse, bei denen eine Vielzahl an Hormonen (z. B.

Prolaktin, Glucocorticoide, Insulin und Wachstumshormon) beteiligt ist (VONDERHAAR & ZISKA 1989; ROSEN ET AL. 1999). Auf transkriptionaler Ebene sind bei der Expression von *PAEP* Transkriptionsfaktoren des Eutergewebes, wie z. B. STAT5A und auch ubiquitäre Faktoren wie z. B. AP1, CREB, NF1, OCT1, SP1, NF-kappaB, GR, TG, YY1, HSE involviert (ROSEN ET AL. 1999; MARTIN ET AL. 2002). Beim Rind sind mehrere Protein-Varianten bekannt. Die häufigsten Varianten, die als A und B bezeichnet werden, unterscheiden sich an zwei Aminosäurepositionen. Promotorpolymorphismen die im Kopplungsungleichgewicht mit der A- bzw. B-Variante des  $\beta$ -Lactoglobulin liegen, bewirken eine unterschiedliche Expression der Varianten (FOLCH ET AL. 1999; PROSSER ET AL. 2000). In diesem Zusammenhang wurden im 5'-flankierenden Bereich Polymorphismen identifiziert und charakterisiert (LUM ET AL. 1997; KUSS ET AL. 2003).

### Polymorphismenanalyse

Über die Sequenzierung der FV-Gründertiere konnten auf BTA11 in dem Bereich von 103.299.664 bis 103.308.381 bp insgesamt 105 SNP detektiert werden. Die Abdeckung der SNP-Positionen in dieser Region ist durchschnittlich 4,19-fach (Standardabweichung 1,19). 17 SNP sind im 5'-flankierenden Bereich, 17 im vorhergesagten Promotor, 2 im 5'-UTR, 46 in Introns, 3 im 3'-UTR sowie 12 im 3'-flankierenden Bereich lokalisiert (Tabelle 9.12). In kodierenden Bereichen konnten die synonymen Varianten T11, I18, N79, N104 sowie R140 und die nicht-synonymen Austausche E61Q, G80D und V134A identifiziert werden. Der SNP PAEP\_45 in Intron 1 (Position 103.302.351 bp) entspricht dem SNP BovineHD1100030066, der in der GWAS am stärksten assoziiert ist. Die Analyse mit *Haploview* ergab ausgedehnte LD-Strukturen in der untersuchten Genregion (Abbildung 4.14). Zahlreiche SNP weisen ein hohes LD mit den Topmarkern der GWAS auf. Die G80D und V134A Substitutionen, die in Zusammenhang mit den  $\beta$ -Lactoglobulin Varianten A und B stehen, sind mit  $r^2 > 0,6$  bzw.  $r^2 > 0,7$  in starkem Kopplungsungleichgewicht mit den signifikantesten Markern BovineHD1100030066 und ARS-BFGL-NGS-31097. Die SNP im Promotor (PAEP\_18 bis PAEP\_34) bilden, mit Ausnahme von PAEP\_23 und PAEP\_29, einen Block mit einem paarweisen LD von  $r^2 > 0,60$ .

Für nahezu alle Polymorphismen wurden Bindestellen für Transkriptionsfaktoren vorhergesagt, die bereits in Zusammenhang mit der Regulation von *PAEP* genannt wurden. Es konnten Bindestellen für die Faktoren AP1, AP2, GR, NF1, NFkappaB, Oct1, SP1 und STAT5A identifiziert werden. In der Analyse standen jedoch nur Sequenzen des humanen und caninen Promotorbereichs als Alignment mit der bovinen Sequenz zur Verfügung, so dass falsch positive Ergebnisse nicht über den Konservierungsgrad ausgeschlossen werden konnten. Die Varianten PAEP\_85 und PAEP\_86 in Intron 5 liegen in unmittelbarer Nähe einer Branch-Site. Mit dem *Human-Splicing-Finder* wurde jedoch keine Auswirkung festgestellt.

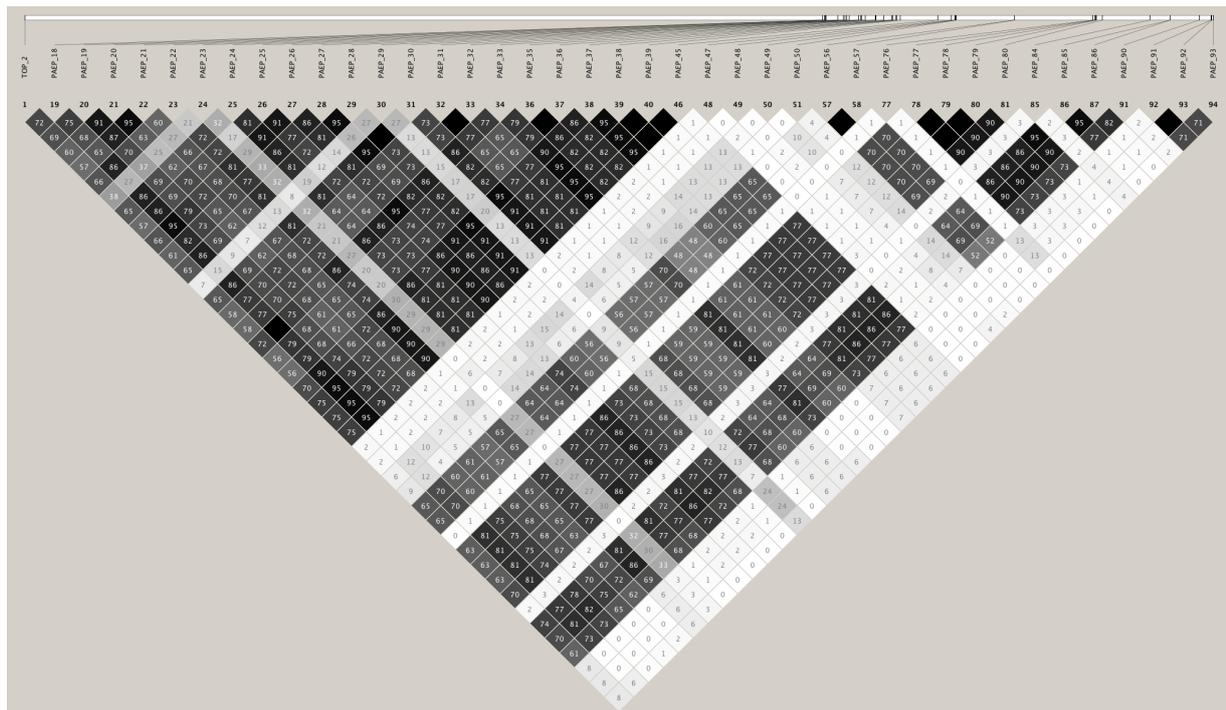


Abbildung 4.14: Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen aus der Next-Generation-Sequenzierung des PAEP-Gens. Das LD wurde als  $r^2$  berechnet. Die Bezeichnung „TOP\_2“ steht für den signifikantesten Marker aus der GWAS (ARS-BFGL-NGS-31097).

### 4.1.4.4 QTL auf BTA14 und das Kandidatengen *DGAT1*

Die stärkste Assoziation mit dem Merkmal FPro aller Laktationsphasen wurde auf BTA14 identifiziert (Abbildung 4.15). In den GWAS der Rassen HF und FV ist stets der das *DGAT1*-Gen beinhaltende QTL am signifikantesten mit dem Merkmal assoziiert.

#### Funktionelle Charakterisierung von *DGAT1*

Das auf BTA14 liegende Gen *DGAT1* kodiert für das hauptsächlich in den Mikrosomen lokalisierte Enzym Diacylglycerol-O-Acyltransferase. DGAT katalysiert den finalen Schritt der Triglycerid-Synthese, indem es das aus dem Glycerol-Phosphat-Stoffwechsel stammende Diacylglycerol kovalent an langkettige Acyl-CoAs bindet (CASES ET AL. 1998). Studien an Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass *DGAT1* neben der Fettspeicherung auch die Laktation beeinflusst, da *DGAT1*<sup>-/-</sup> Mäuse keine Milch produzierten (SMITH ET AL. 2000). *DGAT1* ist damit maßgeblich an der Fettsynthese beteiligt und als Kandidatengen für den Fettgehalt der Milch prädestiniert. In verschiedenen Rinderpopulationen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Milchzusammensetzung und Genvarianten von *DGAT1* festgestellt werden. Insbesondere die Substitution von Lysin zu Alanin (K232A) zeigte starke Assoziationen mit den Merkmalen Milchfettgehalt und -fettmenge (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002) und mit der Fettsäurezusammensetzung der Milch (SCHENNINK

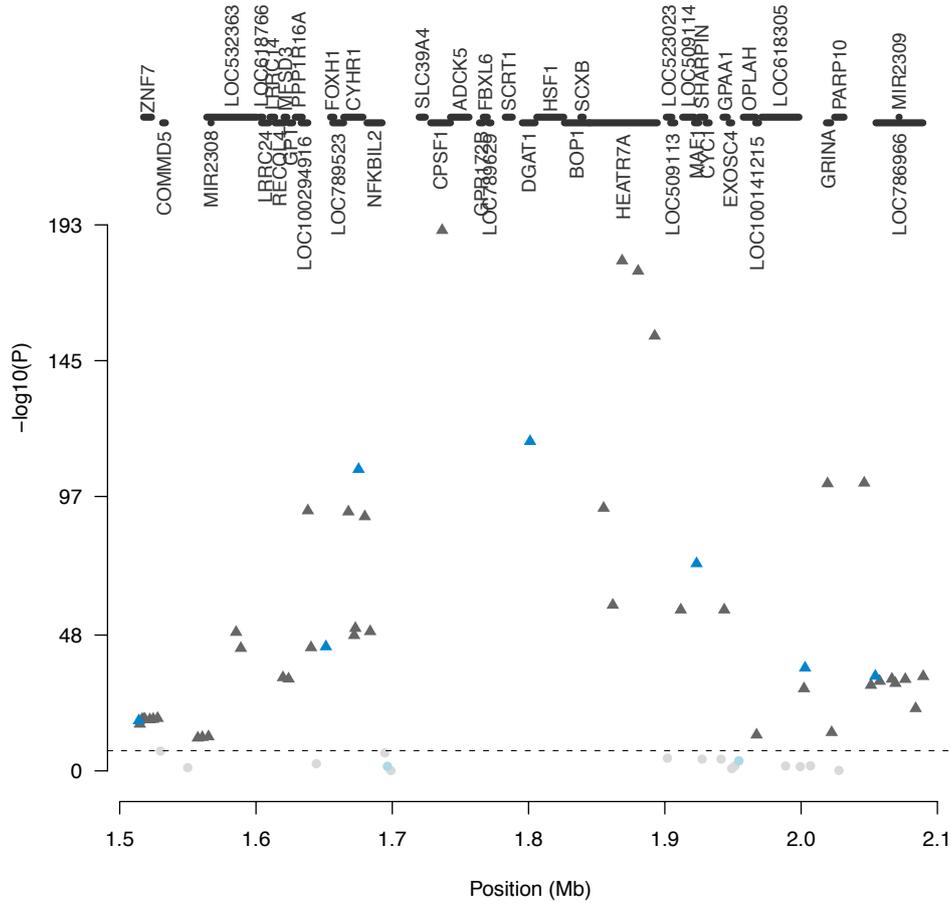


Abbildung 4.15: BTA14 (1,5 - 2,1 Mb) mit den positionellen Kandidatengenen am assoziierten QTL für das Merkmal Fettgehalt Laktationstag 200 bei FV. Signifikant assoziierte Marker ( $P < 7,59 \times 10^{-8}$ ) sind als Dreiecke dargestellt. Blaue Symbole repräsentieren SNP aus der Genotypisierung mit dem Illumina BovineSNP50 BeadChip, graue Symbole stellen SNP des Illumina BovineHD BeadChips dar.

ET AL. 2007). Die Kausalität der K232A-Variante konnte genetisch und funktional bestätigt werden (GRISART ET AL. 2004). Zusätzlich wurde ein Minisatellit (variable number of tandem repeats, VNTR) im 5'-flankierenden Bereich identifiziert (WINTER ET AL. 2002) der eine potentielle Bindestelle für den Transkriptionsfaktor SP1 enthält und bei deutschen HF eine Assoziation mit dem Fettgehalt zeigte (KÜHN ET AL. 2004).

### Polymorphismenanalyse

Die Analyse des *DGAT1*-Gens erfolgte über Daten aus der NGS der 43 FV-Tiere. In dem gewählten Bereich von 1.793.425 bis 1.806.838 bp auf BTA14 konnten insgesamt 26 SNP detektiert werden (Tabelle 9.13). Die durchschnittliche Abdeckung der einzelnen SNP ist für das *DGAT1*-Gen mit einem Wert von 3,26-fach (Standardabweichung 3,75) gering. 2 Polymorphismen sind im 5'-flankierenden Bereich, 17 in Introns, 1 im 3'-UTR, sowie 4 im 3'-flankierenden Bereich. Zusätzlich zu der als kausal postulierten K232A-Variante

## 4 Ergebnisse

(GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002) konnte der nicht-synonyme Austausch E33D identifiziert werden. Die Variante DGAT1\_22 im 3'-UTR liegt im vollständigen Kopplungsungleichgewicht ( $r^2=1,00$ ) mit dem signifikantesten Marker BovineHD1400000216 aus der GWAS. Für diese Variante konnte jedoch kein Einfluss auf mögliche miRNA-Bindestellen vorhergesagt werden. Der nicht-synonyme Austausch K232A (DGAT1\_20) weist ein LD von  $r^2=0,66$  auf. Der signifikanteste Marker aus der GWAS bei HF entspricht dem SNP DGAT1\_18 in Intron 2. Dieser Polymorphismus ist bei den 43 FV-Tieren nur schwach mit der K232A-Substitution gekoppelt ( $r^2=0,18$ ) (Abbildung 4.16). Zwischen Polymorphismen im Promotor und dem Topmarker der GWAS wurde nur ein geringes Kopplungsungleichgewicht ( $r^2<0,20$ ) festgestellt.

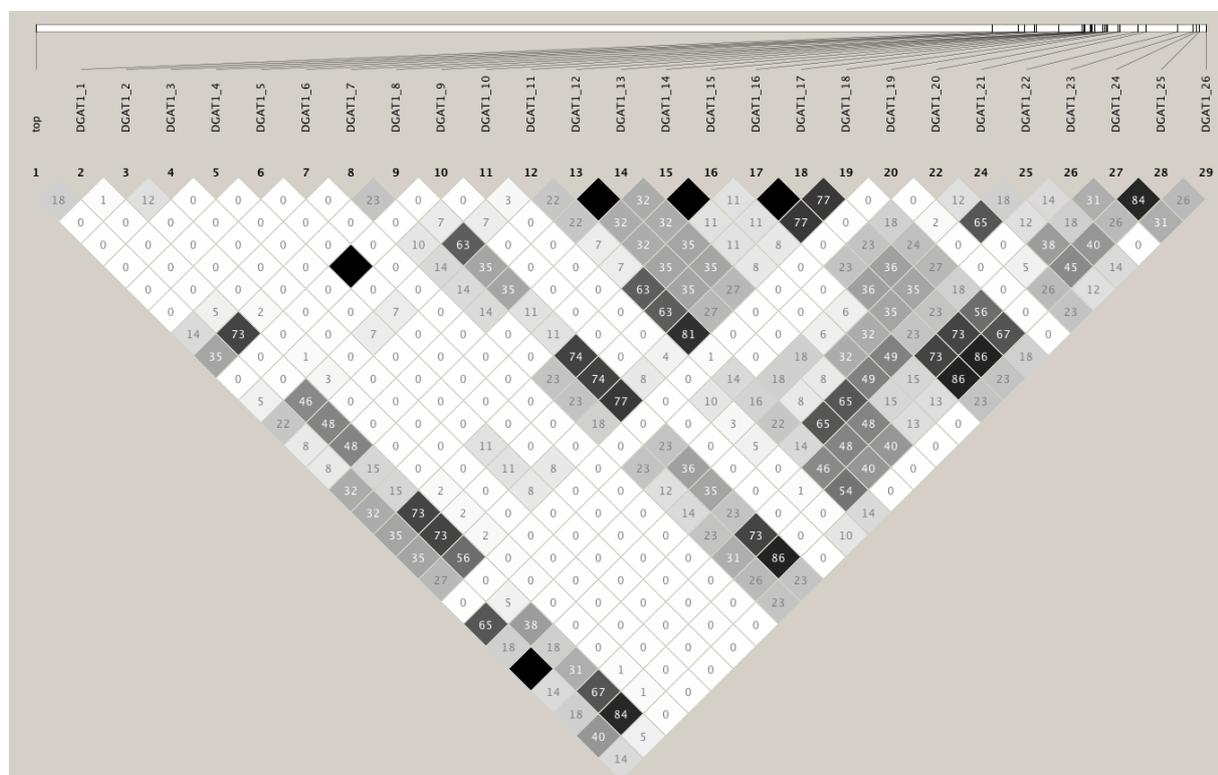


Abbildung 4.16: Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen aus der Next-Generation-Sequenzierung des DGAT1-Gens. Das LD wurde als  $r^2$  berechnet. Die Bezeichnung „top“ steht für den signifikantesten Marker aus der GWAS (BovineHD1400000216).

Die Genotypisierung des K232A-Polymorphismus mittels *TaqMan*-Assay ergab innerhalb der untersuchten HF-Population ein starkes Kopplungsungleichgewicht ( $r^2=0,998$ ) mit dem signifikantesten Marker ARS-BFGL-NGS-4939 des *Illumina BovineSNP50 BeadChips*. Die bekannte kausale Variante K232A zeigt eine geringfügig schwächer signifikante Assoziation ( $P=8,91 \times 10^{-198}$ ) als der Topmarker. Dies ist möglicherweise auf Imputationsungenauigkeiten zurückzuführen, da 3,1 % der Genotypen aus der *TaqMan*-Genotypisierung imputiert wurden (vgl. WANG ET AL. (2012)).

4.1.4.5 QTL auf BTA14 und das Kandidatengen *GPIHBP1*

Durch die Korrektur auf die K232A-Substitution in *DGAT1* konnte bei der Rasse HF auf BTA14 ein weiterer QTL für die Merkmale FPro-ZW, FPro10-20 und FPR10-20 entdeckt werden. Als positionelles und funktionelles Kandidatengen wurde *GPIHBP1* identifiziert (Abbildung 4.17).

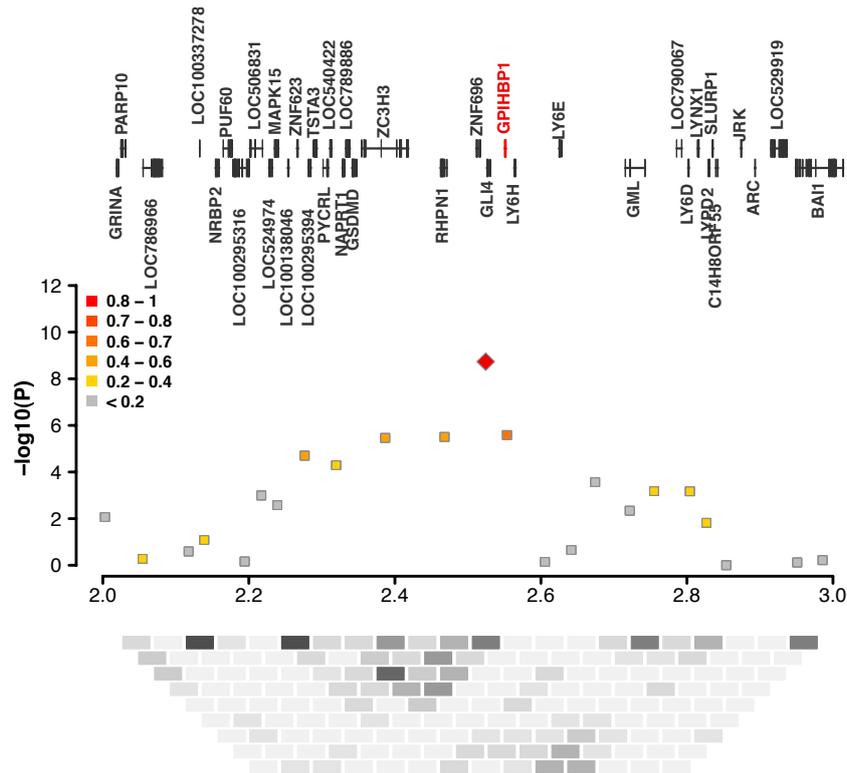


Abbildung 4.17: BTA14 (2,0 - 3,0 Mb) mit den positionellen Kandidatengenen am assoziierten QTL für das Merkmal FPro10-20 bei HF nach Korrektur auf die *DGAT1*-Variante. Die P-Werte der SNP sind auf der y-Achse als negativ dekadischer Logarithmus, die Position der Varianten auf der x-Achse aufgetragen. Der signifikanteste Marker Hapmap30086-BTC-002066 ist als Raute dargestellt. Unterschiedliche Farben der Punkte indizieren das Kopplungsungleichgewicht als  $r^2$  zwischen dem Topmarker und den anderen SNP in der abgebildeten Region. Das paarweise Kopplungsungleichgewicht der Marker ist über die verschiedenen Grautöne dargestellt.

**Funktionelle Charakterisierung von *GPIHBP1***

Das Gen *GPIHBP1* kodiert für das Glycosylphosphatidylinositol-anchored-high-density-Lipoprotein-bindende Protein-1. GPIHBP1 spielt eine entscheidende Rolle in der Lipolyse von Triglycerid-reichen Lipoproteinen (TGRL) aus Chylomikronen und Very-Low-Density-Lipoproteinen durch das Enzym Lipoprotein-Lipase. Das Protein GPIHBP1 bindet dabei an die LPL und wirkt als Plattform für die Hydrolyse von Triglyceriden (SONNENBURG ET AL. 2009). Des Weiteren ermöglicht GPIHBP1 den Transport von LPL in das Innere

der Kapillaren (DAVIES ET AL. 2010). GPIHBP1 ist an den Endothelzellen der Kapillaren lokalisiert und wird, wie die Lipoprotein-Lipase, vor allem im Herzen und im Fettgewebe exprimiert (BEIGNEUX ET AL. 2007). Es reguliert die Versorgung der Zellen mit Lipiden, die für den Energieverbrauch bereitgestellt oder gespeichert werden. LPL wird zudem auch in milchbildendem Gewebe synthetisiert und stellt dort die nötigen Fettsäuren für die Milchfettsynthese bereit (HERNELL & OLIVECRONA 1974). Beim Menschen sind genetische Defekte in Form von Aminosäureaustauschen in der für die Bindung von LPL wichtigen Ly6-Domäne von *GPIHBP1* bekannt. Die missense-Mutationen Q115P, C65Y, C65S, C68G, C68Y, C89F und G175 (FRANSSEN ET AL. 2010; OLIVECRONA ET AL. 2010; BEIGNEUX ET AL. 2009; CHARRIÈRE ET AL. 2011) führen zu einer gestörten Lipoprotein-Triglycerid Hydrolyse und sind für das Krankheitsbild Chylomikronämie verantwortlich. In Zusammenhang mit einem nichtfunktionalen GPIHBP1 wurde ausserdem ein geringer Fettanteil in der humanen Milch und eine veränderte Fettsäurezusammensetzung beschrieben (OLIVECRONA ET AL. 2010). *GPIHBP1* ist bislang nur in der Ordnung *Mammalia* bekannt, was laut YOUNG ET AL. (2011) möglicherweise mit der Produktion von Milch in Zusammenhang steht. Bei einem GPIHBP1-Defekt kommt es auch zu einer Änderung der Fettsäurezusammensetzung. Aus der *de-novo*-Synthese stammende, mittellangkettige, gesättigte Fettsäuren nehmen zu, Fettsäuren aus der Lipolyse von Triglycerid-reichen Lipoproteinen aus dem Plasma nehmen ab (OLIVECRONA ET AL. 2010).

### **Struktureller Aufbau von *GPIHBP1***

Mittels lokaler BLAST-Suche der humanen *GPIHBP1* cDNA-Sequenz (NM\_178172.3) gegen das UMD3.1-Assembly des Rindes konnte das *GPIHBP1*-Gen auf BTA14 bei 2,5 Mb lokalisiert werden. Es liegt damit in unmittelbarer Nähe zum *DGAT1*-Gen (1,8 Mb) und ist auf dem Minus-Strang lokalisiert. Die Annotation mittels *GENOMETHREADER* ergab einen Aufbau aus 4 Exons, was der Genstruktur des humanen *GPIHBP1* entspricht. Alle Intron-Exon-Grenzen folgen der AG-GT Regel als Splice-Recognition-Sites (BREATHNACH ET AL. 1978) (Tabelle 9.6). Das bovine *GPIHBP1* kodiert für 171 Aminosäuren und weist einen Übereinstimmungswert von 56,0% mit der caninen, 54,0% mit der humanen und 50,0% mit der murinen Proteinsequenz auf. Mittels *Neural Network Promoter Prediction* konnte der Transkriptionsstart an Position 2.552.580 bp mit einem Score von 0,99 vorhergesagt werden. Die Analyse auf ein TATA-Signal mittels *HCtata* ergab bei 2.552.901 bp eine mögliche Position. CpG-Inseln in der 5'-flankierenden Region konnten über die Software CpGPlot (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>) nicht festgestellt werden. Ein Poly-A Signal wurde an Position 2.550.291 bp auf BTA14, in einer Entfernung von 97 bp vom Stoppcodon identifiziert.

**Polymorphismenanalyse**

Für die Analyse des *GPIHBP1*-Gens wurden insgesamt 5315 bp in einem Panel von 12 HF-Tieren resequenziert. Dabei wurden die 4 Exons einschließlich mindestens 50 bp der Intron-Akzeptor- und Intron-Donor-Sites sowie 1500 bp der 5'-flankierenden und 3'-flankierenden Bereiche erfasst. Es wurden 6 SNP in der 5'-flankierenden Region, 2 in den Introns und 6 im 3'-UTR gefunden. Zusätzlich wurden in den kodierenden Bereichen die synonymen Basenaustausche D28 in Exon 2 und G145 in Exon 4 verzeichnet (Tabelle 9.14). Trotz relativ gering konservierter Proteinsequenz über verschiedene Spezies hinweg, zeigte sich die Aminosäuresequenz innerhalb der untersuchten Rinder konserviert. Die beim Menschen mit dem Krankheitsbild Chylomikronämie assoziierten missense-Mutationen (FRANSSEN ET AL. 2010; OLIVECRONA ET AL. 2010; BEIGNEUX ET AL. 2009; CHARRIÈRE ET AL. 2011) sind im *GPIHBP1*-Panel nicht vorhanden. Die Überprüfung auf Kopplungsungleichgewicht erfolgte mit *Haploview* unter Einbeziehung des signifikantesten Markers Hapmap30086-BTC-002066 aus der genomweiten Genotypisierung mit dem *Illumina Bovine SNP50 BeadChip* (Abbildung 4.18).

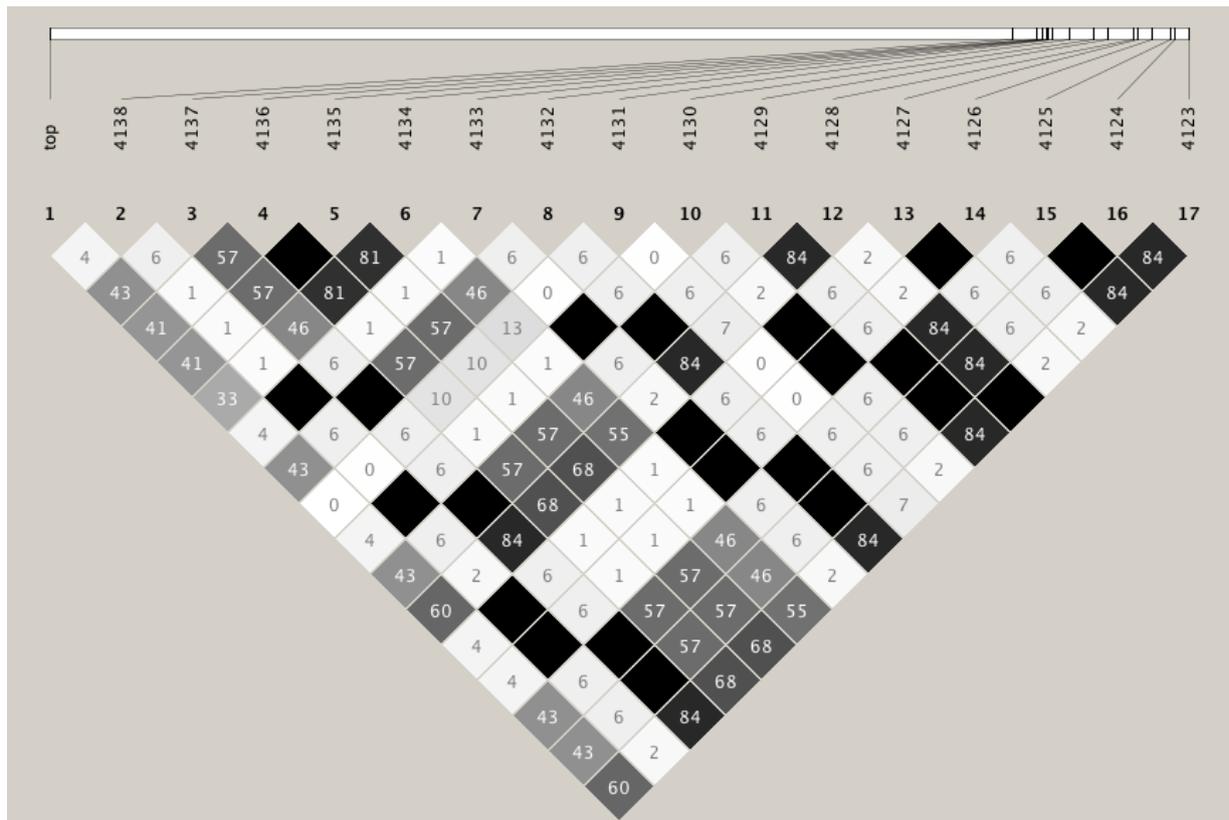


Abbildung 4.18: Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des resequenzierten *GPIHBP1*-Gens. Das LD wurde als  $r^2$  berechnet. Die Bezeichnung top steht für den signifikantesten Marker aus der GWAS (*Hapmap30086-BTC-002066*).

Die SNP TUM-4123 im 5'-flankierenden Bereich und TUM-4128 im 5'-UTR weisen mit  $r^2=0,60$  das stärkste Kopplungsungleichgewicht mit dem Marker Hapmap30086-BTC-

002066 (Position 2.524.432 bp) auf und liegen selbst im vollständigen Kopplungsungleichgewicht ( $r^2=1,00$ ) im untersuchten Tierpanel vor. Weitere SNP mit moderatem LD ( $r^2=0,41 - 0,43$ ) sind TUM-4124 und TUM-4125 im 5'-flankierenden Bereich, TUM-4129 in Intron 1, der synonyme Austausch TUM-4132 in Exon 4 (G145), TUM-4133 und TUM-4134 im 3'-UTR und die Polymorphismen im 3'-flankierenden Bereich TUM-4135, TUM-4136 und TUM-4137. SNP mit  $r^2 < 0,10$  wurden in weiterführenden Analysen nicht berücksichtigt. Bei diesen SNP handelte es sich hauptsächlich um Polymorphismen die nur in einem Tier des *GPIHBP1*-Panels in heterozygoter Form vorliegen. Die SNP TUM-4123, TUM-4124 und TUM-4125 im Promotor-Bereich sowie der TUM-4128 im 5'-UTR wurden auf potentielle TFBS analysiert. Über die Transkriptionsfaktoren, die bei der Regulation des *GPIHBP1*-Gens wirken ist bislang wenig bekannt (YOUNG ET AL. 2011). Studien an Mäusen lassen jedoch vermuten, dass PPAR- $\gamma$  einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von *GPIHBP1* hat (DAVIES ET AL. 2008). Die Analyse mittels *ConTra* unter Verwendung der *TRANSFAC*-Matrix ergab, dass keiner der detektierten Polymorphismen im bovinen *GPIHBP1* im Bereich potentieller Bindestellen für PPAR- $\gamma$  liegt.

Für die Polymorphismen TUM-4123 und TUM-4124 wurden keine plausiblen TFBS vorhergesagt. Der SNP TUM-4125 konnte mit *ConTra* nicht analysiert werden, da dieser Bereich der bovinen Sequenz im verwendeten multi-Species-Alignment (UCSC multiz 17way 5000 upstream) nicht enthalten ist. Eine Analyse mit *AliBaba 2.1* ergab keine relevanten Änderungen auf TFBS durch den Polymorphismus. Für den SNP TUM-4128 konnte eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor CREB vorhergesagt werden (Abbildung 4.27). Das cAMP-Response-Element-Binding (CREB) ist ein zellulärer Transkriptionsfaktor der unter anderem an Adipozyten-spezifische Promotoren bindet und die Transkription von Genen des Fettstoffwechsels (KIM ET AL. 2010) und der Gluconeogenese (CHAKRAVARTY ET AL. 2005) reguliert. CREB wird mit Prozessen der Adipogenese in Verbindung gebracht, indem es die Differenzierung (REUSCH ET AL. 2000) und Apoptose von Adipozyten steuert (REUSCH & KLEMM 2002). Bei CREB-mutierten Mäusen konnten Störungen der Laktationsfähigkeit beobachtet werden (MANTAMADIOTIS ET AL. 2006). Ob es sich bei dem Polymorphismus TUM-4128 um eine kausale Variante handelt, die die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren beeinflusst, konnte jedoch nicht vollständig geklärt werden. Der intronische SNP TUM-4129 hatte keinen Einfluss auf vorhergesagte Branch-Sites. Für den synonymen Austausch TUM-4132 konnten ebenfalls keine funktionalen Zusammenhänge ermittelt werden. Für den im 3'-UTR positionierten Polymorphismus TUM-4134 wurden keine potentiellen miRNA-Bindestellen vorhergesagt.

Der SNP TUM-4128 wurde mittels *TaqMan*-Assay an HF-Tieren aus der GWAS genotypisiert und die Genotypen in die genomweiten Assoziationsstudie implementiert. Die Variante TUM-4128 zeigte jedoch im Gegensatz zu dem in der GWAS identifizierten signifikanten

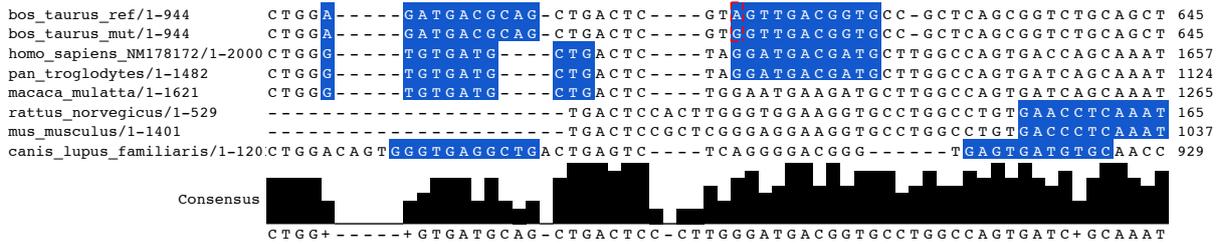


Abbildung 4.19: Transkriptionsfaktorbindestelle für CREB (blau) an SNP TUM-4128 mittels ConTra unter Verwendung der TRANSFAC-Datenbank. Der Austausch TUM-4128 (A>G) ist rot-markiert.

Marker Hapmap30086-BTC-002066 ( $P=4,76 \times 10^{-8}$  bei FPro-ZW und  $P= 1,84 \times 10^{-9}$  bei FPro10-20), keine signifikante Assoziation.

#### 4.1.4.6 QTL auf BTA19 und das Kandidatengen FASN

Für den Fettgehalt der Laktationstage 15 bis 25 wurde bei der Rasse FV eine signifikante Assoziation auf BTA19 festgestellt. Als positionelles und funktionelles Kandidatengen konnte FASN identifiziert werden (Abbildung 4.20).

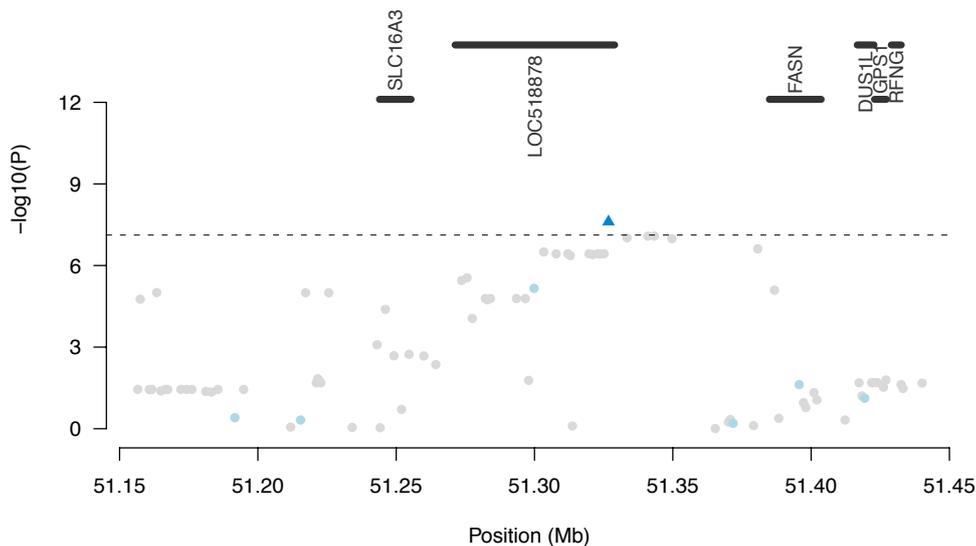


Abbildung 4.20: BTA19 (51,2 - 51,4 Mb) mit den positionellen Kandidatengen am assoziierten QTL für das Merkmal Fettgehalt Laktationstag 20 bei FV. Signifikant assoziierte Marker ( $P < 7,59 \times 10^{-8}$ ) sind als Dreiecke dargestellt. Blaue Symbole repräsentieren SNP aus der Genotypisierung mit dem Illumina BovineSNP50 BeadChip, graue Symbole stellen SNP des Illumina BovineHD BeadChips dar.

#### Funktionelle Charakterisierung von FASN

Das multifunktionale Enzym Fettsäure-Synthase spielt eine zentrale Rolle in der *de-novo*-Lipogenese bei Säugetieren und Vögeln. FAS besitzt 7 katalytische Zentren, die alle

Reaktionsschritte bei der Umwandlung von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in Palmitinsäure katalysieren. Das Enzym synthetisiert im Eutergewebe Fettsäuren von C4:0 bis C16:0 (MORRIS ET AL. 2007). Im Gegensatz zu Monogastriern, wo die Lipogenese hauptsächlich in der Leber stattfindet, erfolgt bei Wiederkäuern die Expression des für die Fettsäure-Synthase kodierenden Gens *FASN* vor allem in Fettgewebe und nur in limitierter Kapazität in der Leber (ROY ET AL. 2005). Die Regulation von FAS erfolgt überwiegend auf transkriptionaler Ebene und über die Stabilität der messenger RNA (mRNA) (HILLGARTNER ET AL. 1995). Bei Mensch und Ratte konnten potentielle transkriptionale, regulatorische Elemente in der 5'-flankierenden Region mit Wirkung auf die gewebespezifische Expression identifiziert werden (HSU ET AL. 1996; OSKOUIAN ET AL. 1997). Zusätzlich konnte in einer Studie von ROY ET AL. (2005) beim Rind eine weitere Transkriptvariante nachgewiesen werden, wobei das durch alternatives Splicing entstandene, verkürzte FAS-Protein vermutlich als zusätzlicher Regulationsmechanismus agiert. Die Sequenz des bovinen *FASN*-Gens ist sehr stark mit den orthologen Genen bei Mensch und Ratte konserviert (ROY ET AL. 2005). Beim bovinen *FASN*-Gen konnten dennoch mehrere Polymorphismen nachgewiesen werden, die eine Assoziation mit der Fettsäurezusammensetzung in Milchfett und Fettgewebe (MORRIS ET AL. 2007; ABE ET AL. 2009) sowie dem Milchfettgehalt (ROY ET AL. 2006) aufwiesen. Ein regulatorischer Effekt wurde für die in einer potentiellen Bindestelle für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 liegende Variante (g.763G>C) beschrieben (ORDOVÁS ET AL. 2008). Diese, im nicht-translatierten Exon 1 lokalisierte Variante, ist bereits mit dem Fettgehalt der Milch in Verbindung gebracht worden (ROY ET AL. 2006).

Das für die Fettsäure-Synthase kodierende Gen *FASN* ist dem UMD3.1-Assembly entsprechend auf BTA19 bei 51,4 Mb lokalisiert. Das Gen besteht aus 42 Exons, wobei das erste Exon nicht translatiert wird. Die Annotation basierend auf dem UMD3.1-Assembly entspricht der bereits postulierten Version von *FASN* (ROY ET AL. 2005).

### Polymorphismenanalyse

Über die Sequenzierung der FV-Gründertiere konnten in dem gewählten Bereich 51.382.922 bis 51.405.614 bp auf BTA19 für das *FASN*-Gen 61 SNP detektiert werden. Je ein SNP wurde im Promotor, 5'-UTR und 3'-UTR identifiziert. Insgesamt 37 SNP sind in Introns, 4 im 3'-flankierenden Bereich, sowie 17 im kodierenden Bereich lokalisiert. Die Abdeckung der SNP-Positionen in diesem Bereich ist durchschnittlich 4,23-fach (Standardabweichung 4,13). Eine vollständige Auflistung der SNP ist im Anhang (Tabelle 9.15) aufgeführt.

Mittels *Haploview* konnte das Kopplungsungleichgewicht zwischen den identifizierten Polymorphismen und dem signifikantesten Marker ARS-BFGL-NGS-39328 auf BTA19 für den FPro der Laktationstage 15 ( $P=6,56 \times 10^{-8}$ ), 20 ( $P=2,46 \times 10^{-8}$ ) und 25 ( $P=2,07 \times 10^{-8}$ ) bestimmt werden (Abbildung 4.21). Die SNP mit den höchsten  $r^2$ -Werten sind in Tabelle 4.6

aufgelistet. Bei dem SNP FASN\_2 (Position 51.384.984 bp,  $f(C)=0,37$ ,  $r^2=0,76$ ) handelt es sich um die Variante g.763G>C die eine mögliche Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 darstellt (ORDOVÁS ET AL. 2008). Der als kausal postulierte Polymorphismus FASN\_2 liegt im LD mit dem Topmarker ARS-BFGL-NGS-39328, wenn auch nicht so stark wie andere SNP (FASN\_8 und FASN\_10), die rein funktional keine derart vielversprechenden Kandidaten-SNP sind. Die Abdeckung an der Position der FASN\_2-Variante ist mit 1,77-fach jedoch vergleichsweise niedrig, so dass das berechnete LD möglicherweise durch Imputationsungenauigkeiten verursacht wird.

*Tabelle 4.6: SNP des FASN-Gens mit dem stärksten LD zum Topmarker.*

SNP-ID	Position (bp)	Region	Allele	MAF	LD (als $r^2$ ) mit ARS-BFGL-NGS-39328	Abdeckung
FASN_2	51.384.984	5'-UTR	C>G	C (0,37)	0,76	1,77
FASN_8	51.387.607	Intron 2	C>G	C (0,33)	0,95	3,91
FASN_10	51.388.204	Intron 3	C>T	T (0,33)	0,85	5,23
FASN_14	51.388.923	Intron 3	G>C	G (0,24)	0,64	3,60

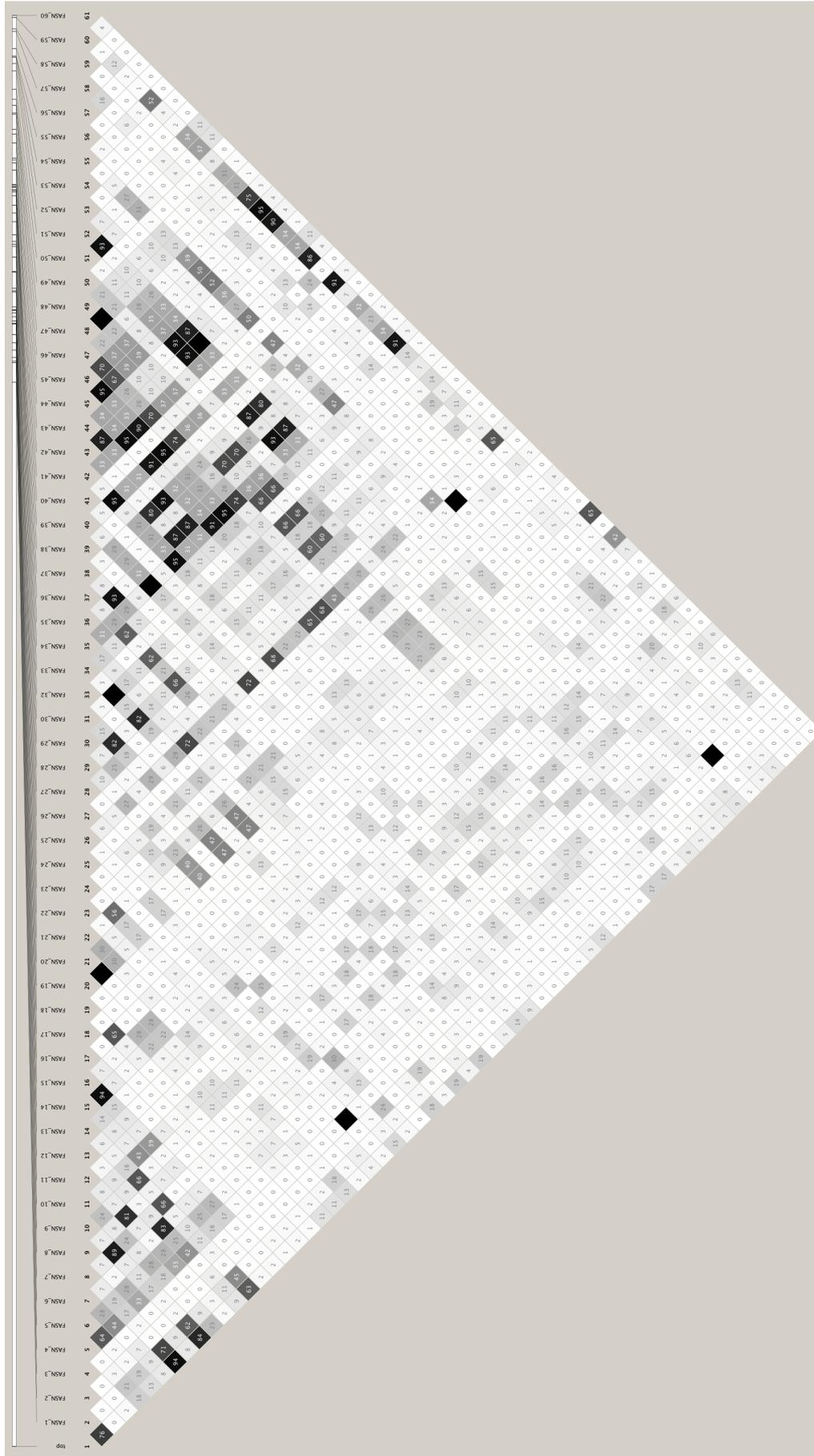


Abbildung 4.21: Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen aus der NGS des FASN-Gens. Das LD wurde als  $r^2$  berechnet. Die Bezeichnung „top“ steht für den signifikantesten Marker aus der GWAS ARS-BFGL-NGS-39328.

4.1.4.7 QTL auf BTA20 und das Kandidatengen *GHR*

Auf BTA20 konnten signifikante Assoziationen mit dem Merkmal FPro-ZW bei HF und Fettgehalt der Laktationstage 150 bis 300 bei FV identifiziert werden. Die Positionen der signifikantesten Marker deuten auf das Kandidatengen *GHR* hin (Abbildung 4.22).

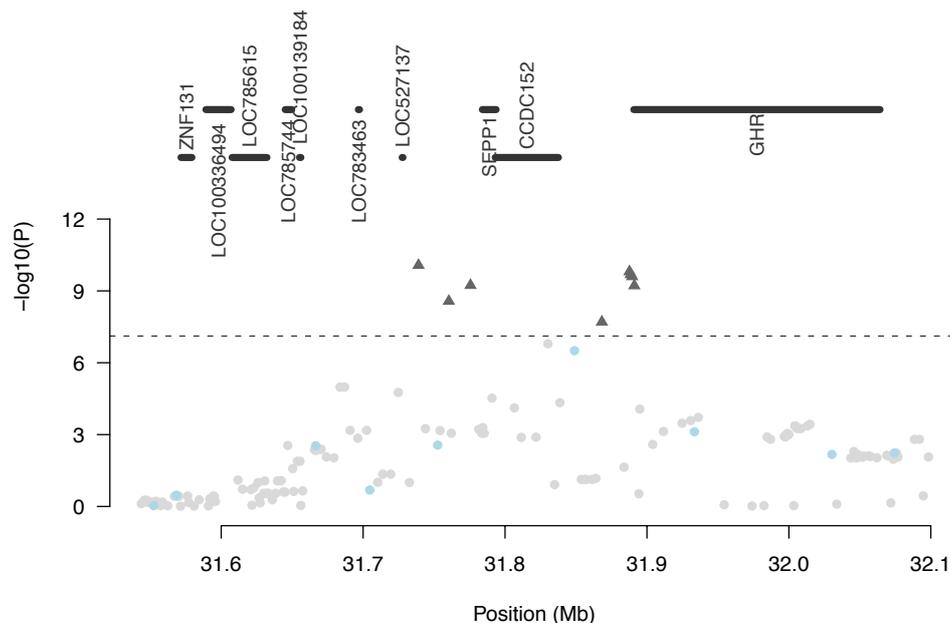


Abbildung 4.22: BTA20 (31,5 - 32,1 Mb) mit den positionellen Kandidatengen am assoziierten QTL für das Merkmal Fettgehalt Laktationstag 200 bei FV. Signifikant assoziierte Marker ( $P < 7,59 \times 10^{-8}$ ) sind als Dreiecke dargestellt. Blaue Symbole repräsentieren SNP aus der Genotypisierung mit dem Illumina BovineSNP50 BeadChip, graue Symbole stellen SNP des Illumina BovineHD BeadChips dar.

Funktionelle Charakterisierung von *GHR*

Das Wachstumshormon (GH) zählt zur Familie der Somatotropin-Hormone und ist in Prozesse des Wachstums, des Fettstoffwechsels und der Laktation involviert (ETHERTON & BAUMAN 1998). GH regelt die Verteilung von Nährstoffen im Körper, so dass während der Laktation Energie für die Milchsynthese bereitgestellt wird (LUCY ET AL. 2001). Die Verabreichung von Somatotropin führt bei Rindern zu einer Steigerung der Milchleistung sowie in der Phase der NEB zu einer verstärkten Lipolyse im Fettgewebe (ETHERTON & BAUMAN 1998). Der Wachstumshormon-Rezeptor (GHR) übermittelt die biologische Aktivität des Wachstumshormons auf die Zielzellen und nimmt damit ebenfalls eine bedeutende Rolle im Fettstoffwechsel und in der Milchsynthese ein. Beim bovinen *GHR* wurden bereits Assoziationen mit Wachstumsmerkmalen (GE ET AL. 2003) und Milchmerkmalen (FALAKI ET AL. 1997; BLOTT ET AL. 2003; VIITALA ET AL. 2006) festgestellt. Die Regulation von GHR ist komplex, da mehrere Promotor-Regionen die Transkription von *GHR* regulieren

(LUCY ET AL. 2001). Bislang konnten verschiedene Polymorphismen im bovinen *GHR*-Gen identifiziert werden (MOISIO ET AL. 1998; GE ET AL. 2003; BLOTT ET AL. 2003; WATERS ET AL. 2012), wobei die F279Y-Substitution in Exon 7 als kausal angesehen wird (BLOTT ET AL. 2003).

### Polymorphismenanalyse

Durch die Sequenzanalyse des für den GHR kodierenden Gens, einschließlich der angrenzenden regulatorischen Regionen im Bereich von 31.888.736 bis 32.066.200 bp auf BTA20, wurden insgesamt 694 Polymorphismen in den 43 FV-Gründertieren identifiziert. Die als kausal postulierte F279Y-Substitution (BLOTT ET AL. 2003) ist mit einer Allelfrequenz von 0,06 vertreten und weist auf Basis der NGS-Daten ein Kopplungsungleichgewicht von  $r^2=0,19$  mit dem signifikantesten Marker BovineHD2000009150 aus der GWAS auf. Zusätzlich konnten 4 nicht-synonyme (N528T, A536T, S555G und T563I) und 6 synonyme Austausch (D365, L422, N494, T512, H545 und L603) in den Exons detektiert werden. Insgesamt 661 Polymorphismen befinden sich in intronischen Bereichen, 5 in der 5'-flankierenden Region, 1 SNP im 3'-UTR, sowie 16 in 3'-Richtung. Die durchschnittliche Abdeckung ist 6,24-fach (Standardabweichung 4,19). In die weiteren Untersuchungen gingen nur SNP ein, die in kodierenden oder regulatorischen Regionen lokalisiert sind (Tabelle 9.16). Intronische Polymorphismen die mehr als 50 bp von den Exons entfernt liegen, wurden nicht weiter betrachtet. Die Analyse des Kopplungsungleichgewichts der einzelnen SNP mit dem Marker BovineHD2000009150 aus der GWAS ergab ein hohes LD mit dem synonymen Austausch H545H GHR\_18 ( $r^2=0,75$ ), dem SNP GHR\_22 im 3'-UTR ( $r^2=0,72$ ) und der nicht-synonymen Variante N528T GHR\_16 ( $r^2=0,61$ ) (Abbildung 4.23). Die Varianten GHR\_28, GHR\_33, GHR\_34, GHR\_35 und GHR\_36 in der 3'-flankierenden Region weisen das höchste LD auf ( $r^2 > 0,75$ ). Die N528T-Substitution wurde mittels *PolyPhen-2* mit einem Wert von 0,063 als neutral (Sensitivität 0,94; Spezifität 0,84), die als kausal postulierte F279Y-Variante (BLOTT ET AL. 2003) hingegen mit einem Wert von 0,97 als potentiell negativ eingestuft (Sensitivität 0,78; Spezifität 0,95). Die H545-Variante wurde bereits als assoziiert mit der Abgangsrate und dem Kalbeintervall beschrieben (WATERS ET AL. 2012), eine funktioneller Zusammenhang konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Die Analyse mit *MicroCosmTargets* und *TargetScanHuman* ergab keinen Einfluss von GHR\_22 oder anderen SNP im 3'-flankierenden Bereich auf miRNA-Bindestellen.

Die Genotypisierung der Variante F279Y bei HF ergab ein schwaches Kopplungsungleichgewicht ( $r^2=0,2$ ) mit dem Topmarker des *Illumina BovineSNP50 BeadChip* bei deutlich höherer Signifikanz ( $P=7,03 \times 10^{-12}$ ).

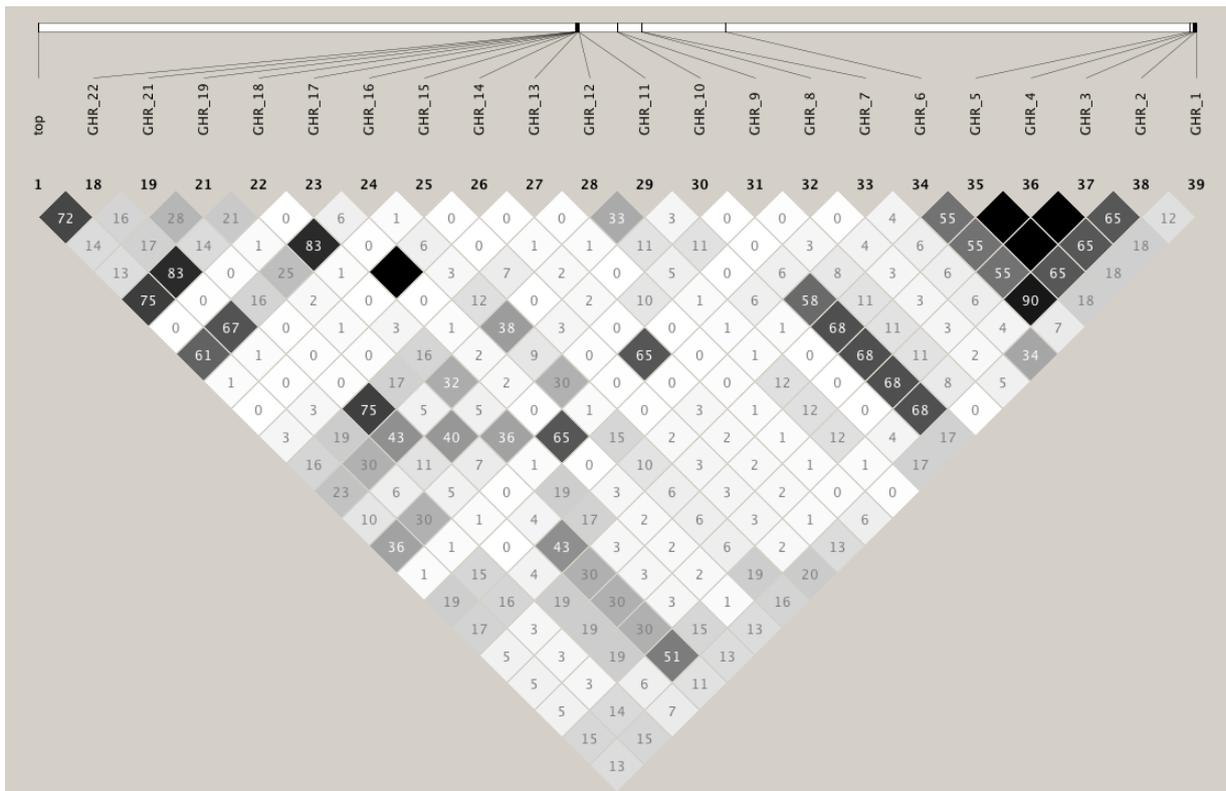


Abbildung 4.23: Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen aus der NGS des GHR-Gens. Das LD wurde als  $r^2$  berechnet. Die Bezeichnung „top“ steht für den signifikantesten Marker aus der GWAS (BovineHD2000009150).

#### 4.1.4.8 QTL auf BTA27 und das Kandidatengen *GPAT4*

Bei der Rasse HF konnten für die Merkmale FPro-ZW und FPro10-20 signifikante Assoziationen auf BTA27 identifiziert werden die auf *GPAT4* als Kandidatengen hindeuten (Abbildung 4.24). Der QTL auf BTA27 wurde auch bei der Rasse FV für das Merkmal FPro der Laktationstage 10 bis 25 bestätigt.

#### Funktionelle Charakterisierung von *GPAT4*

Die Synthese von Triacylglycerol erfolgt in mehreren Schritten über die beteiligten Enzyme GPAT, AGPAT und DGAT. Die durch das Gen *GPAT4* kodierte Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase katalysiert die Umwandlung von Glycerol-3-Phosphat (G3P) und Fett-Acyl-CoA in Lysophosphatsäure (LPA). Im darauf folgenden Schritt wird ein weiteres Fett-Acyl-CoA an LPA zu Phosphatidat verestert. Dieser Schritt wird durch Acyl-Glycerophosphat-Acyltransferasen katalysiert. Das *GPAT4*-Gen wird häufig unter dem Synonym *AGPAT6* genannt. In Studien konnten CHEN ET AL. (2008) jedoch nachweisen, dass *AGPAT6* als Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase fungiert und nicht in den von *AGPAT* katalysierten Schritt involviert ist. In dieser Arbeit wird daher die Bezeichnung *GPAT4* verwendet.

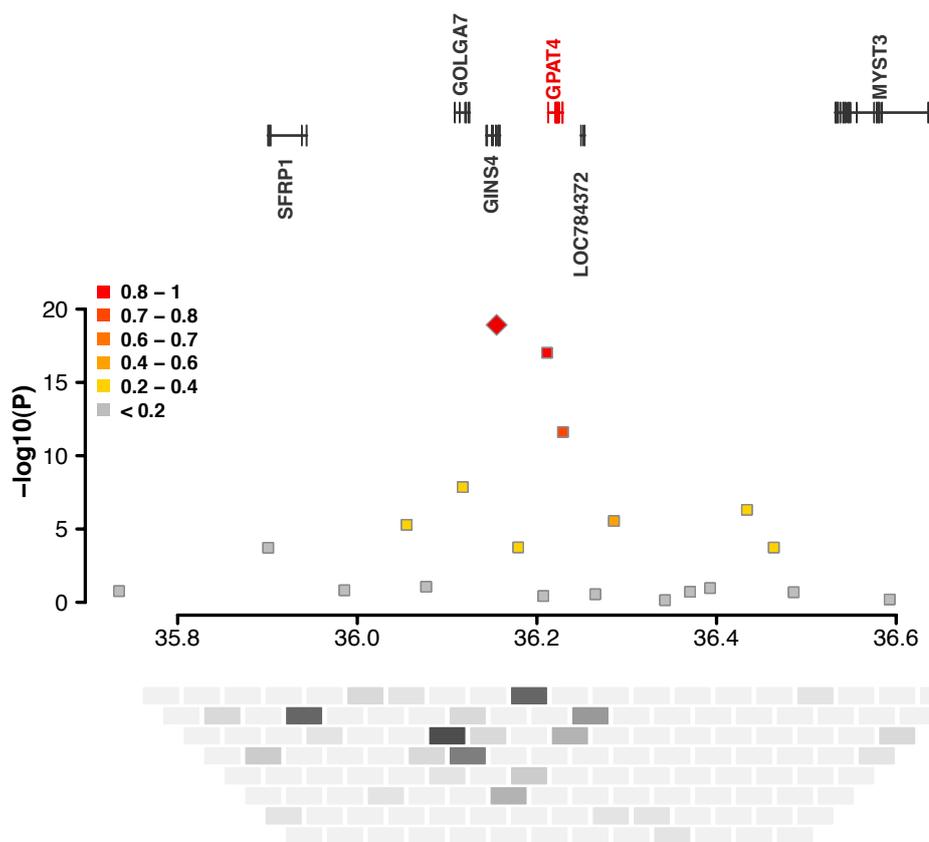


Abbildung 4.24: BTA27 (35,7 - 36,7Mb) mit den positionellen Kandidatengenomen am assoziierten QTL für das Merkmal FPro10-20 bei HF. Die P-Werte der SNP sind auf der y-Achse als negativ dekadischer Logarithmus, die Position der Varianten auf der x-Achse aufgetragen. Der signifikanteste Marker ARS-BFGL-NGS-574485 ist als Raute dargestellt. Unterschiedliche Farben der Punkte indizieren das Kopplungsungleichgewicht als  $r^2$  zwischen dem Topmarker und den anderen SNP in der abgebildeten Region. Das paarweise Kopplungsungleichgewicht der Marker ist über die verschiedenen Grautöne dargestellt.

*GPAT4* wird hauptsächlich in plurivakuolärem Fettgewebe, Leber- und Eutergewebe exprimiert (VERGNES ET AL. 2006). RUDOLPH ET AL. (2007) stellten fest, dass die Expression von *GPAT4* unabhängig von der Ernährung erfolgt. Die Laktationsphase hingegen hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität von *GPAT4* (BIONAZ & LOOR 2008a). Die Regulation von *GPAT4* ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise sind die für den Fettstoffwechsel wichtigen Transkriptionsfaktoren PPAR und SREB an der Expression von *GPAT4* beteiligt (LU ET AL. 2005; BIONAZ & LOOR 2008b). Da *GPAT4* als eines der Schlüsselenzyme in die Triglycerid-Synthese involviert ist, können Störungen bei diesem für die Energiespeicherung und den Fettmetabolismus wichtigen Stoffwechselweg zu Erkrankungen wie Hyperlipidämie, Fettleibigkeit und Lipodystrophie führen (VERGNES ET AL. 2006). In Mausmodellen konnte die Funktion von *GPAT4* weitestgehend aufgeklärt werden (BEIGNEUX ET AL. 2006; NAGLE ET AL. 2008). *GPAT4*<sup>-/-</sup> Mäuse haben ein verringertes Körpergewicht und einen geringeren Anteil an Körperfett.

Zudem sind sie gegenüber genetisch induzierter und ernährungsbedingter Fettleibigkeit resistent. Da *GPAT4* die Synthese von Triacylglycerol im Eutergewebe beeinflusst, ist die Bildung von Milchfett bei Knockout-Mäusen soweit gestört, dass eine Ernährung der Nachkommen nicht erfolgen kann (BEIGNEUX ET AL. 2006). Aufgrund der funktionellen Zusammenhänge mit dem Fettstoffwechsel wurde *GPAT4* als wichtiges Kandidatengen für den Milchfettgehalt angesehen.

### Struktureller Aufbau von *GPAT4*

Das bovine *GPAT4*-Gen konnte über die humane mRNA-Sequenz (NM\_178819.3) auf BTA27 bei 36,2 Mb lokalisiert werden. Die Annotation mittels *GENOMETHREADER* ergab beim Rind einen Aufbau aus 12 Exons. Die Intron-Exon-Grenzen entsprechen ausnahmslos der AG-GT Regel für Splice-Recognition-Sites (BREATHNACH ET AL. 1978) (Tabelle 9.6). Das für 456 Aminosäuren kodierende *GPAT4*-Gen weist Übereinstimmungswerte von 97,0 % mit der humanen, caninen und murinen Proteinsequenz auf. Der Transkriptionsstart wurde an Position 36.211.800 bp mit einem Score von 0,87 vorhergesagt. Eine Bindestelle für das TATA-bindende-Protein (TBP) in Form einer TATA-Box konnte mit *HCtata* für Position 36.210.931 bp ermittelt werden. Es wurden keine CpG-Inseln mit der Software *CpGPlot* vorhergesagt. Poly-A Signale wurden mit *PolyAH* an Position 36.228.988 und 36.229.910 bp, mit Entfernungen von 575 bp bzw. 1497 bp zum Stopcodon vorhergesagt.

### Polymorphismenanalyse

Durch die Resequenzierung der Exons und regulatorischen, flankierenden Regionen in einem Tierpanel von 12 HF-Bullen konnten insgesamt 30 Polymorphismen detektiert werden (Tabelle 9.17). 7 SNP sind im 5'-flankierenden Bereich, 3 SNP im nicht-translatierten Bereich von Exon 1, 12 in den Introns und 6 in der 3'-flankierenden Region lokalisiert. In den kodierenden Bereichen wurden 2 synonyme SNP (TUM-3979 bei T24 und TUM-3980 bei T114) erfasst. Die Aminosäuresequenz zeigt sich innerhalb des untersuchten Panels stark konserviert. Die Analyse des Kopplungsungleichgewichts mit *Haploview* für alle identifizierten Polymorphismen ergab einen  $r^2$ -Wert von 1,00 für die SNP TUM-3974, TUM-3975, TUM-3977, TUM-3982 und TUM-3994 mit dem signifikantesten Marker ARS-BFGL-NGS-574485 aus der GWAS (Abbildung 4.25). Bei den mittels NGS erfassten Genotypen weisen diese SNP nur ein vergleichsweise geringes LD ( $r^2 < 0,36$ ) mit dem Topmarker BovineHD2700010364 auf (Abbildung 4.26).

Die SNP TUM-3974 und TUM-3975 im 5'-flankierenden Bereich wurden auf potentielle TFBS mit *ConTra* überprüft. Dabei wurden für den SNP TUM-3975 keine Auswirkungen auf mögliche funktionelle Transkriptionsfaktoren ermittelt. Für die Variante TUM-3974 hingegen konnten Bindestellen für PAX5, PPAR $\alpha$ :RXR $\alpha$  und CREB vorhergesagt werden.

## 4 Ergebnisse



Abbildung 4.25: Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen des resequenzierten GPAT4-Gens bei HF. Das LD wurde als  $r^2$  berechnet. Die Bezeichnung „top“ steht für den signifikantesten Marker aus der GWAS (ARS-BFGL-NGS-574485).

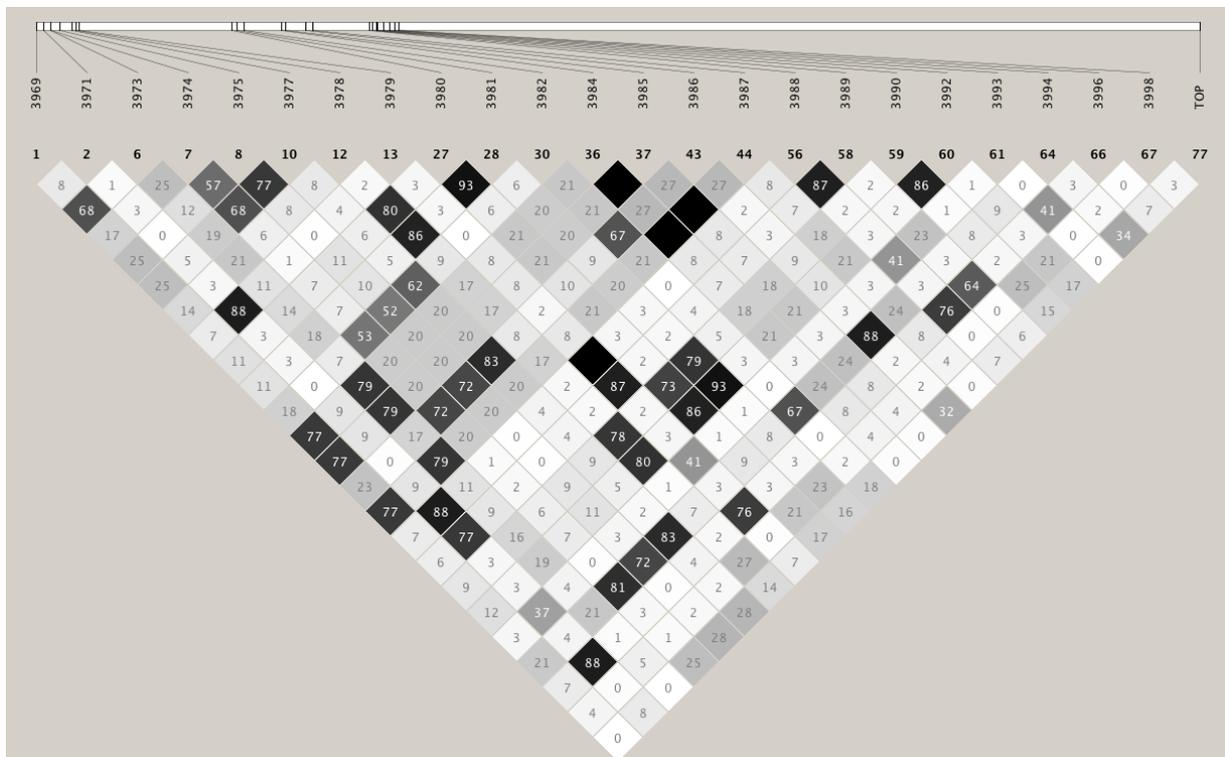


Abbildung 4.26: Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen aus der NGS des GPAT4-Gens bei FV. Das LD wurde als  $r^2$  berechnet. Die Bezeichnung „top“ steht für den signifikantesten Marker aus der GWAS (BovineHD2700010364).

Das Paired-Box-Protein 5 (PAX5) fungiert als Transkriptionsfaktor in der Differenzierung von B-Lymphozyten (COBALEDA ET AL. 2007). Zusammenhänge mit Prozessen des Fettstoffwechsels sind nicht bekannt. Die Bindestelle für CREB liegt angrenzend an den GA>T Polymorphismus TUM-3974. CREB ist ein zellulärer Transkriptionsfaktor der unter anderem an Adipozyten-spezifische Promotoren bindet und die Transkription von Genen des Fettstoffwechsels (KIM ET AL. 2010) und der Gluconeogenese (CHAKRAVARTY ET AL. 2005) reguliert. CREB wird mit Prozessen der Adipogenese in Verbindung gebracht, indem es die Differenzierung (REUSCH ET AL. 2000) und Apoptose von Adipozyten steuert (REUSCH & KLEMM 2002). Bei CREB-mutierten Mäusen konnten Störungen der Laktationsfähigkeit beobachtet werden (MANTAMADIOTIS ET AL. 2006). Die Bindestelle für PPAR $\alpha$ :RXR $\alpha$  wurde nur für das T-Allel vorhergesagt. Der Transkriptionsfaktor PPAR $\alpha$  ist in die Regulation von Genen des Fettstoffwechsels involviert und wurde bereits für Gene der Triglyceridsynthese, wie *AGPAT6* beschrieben (RAKSHANDEHROO ET AL. 2010). Die den SNP TUM-3974 flankierende Region ist über die Spezies hinweg konserviert, jedoch konnten PAX-5, CREB und PPAR $\alpha$ :RXR $\alpha$  nicht speziesübergreifend identifiziert werden.

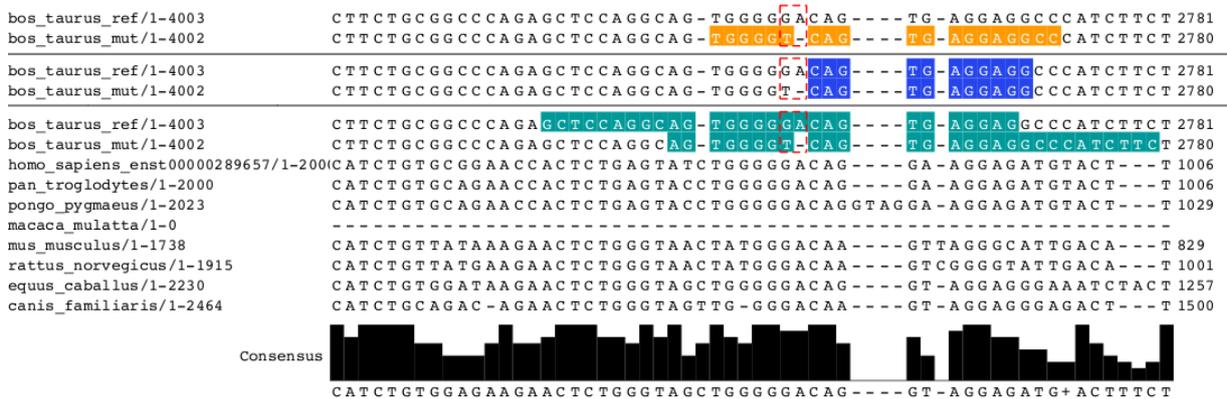


Abbildung 4.27: Vorhergesagte Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren PPAR $\alpha$ :RXR $\alpha$  (orange), CREB (blau) und PAX-5 (türkis) an SNP TUM-3974 mittels ConTra unter Verwendung der TRANSFAC-Datenbank. Der Austausch TUM-3974 (GA>T) ist rot-markiert. Die Höhe der schwarzen Balken der Consensus-Sequenz gibt den Grad der Konservierung an.

Für den intronischen SNP TUM-3982 wurden keine Auswirkungen auf Branch-Points festgestellt. Die Überprüfung auf miRNA Bindestellen im 3'-UTR mittels *MicroCosmTargets* ergab eine mögliche Bindestelle für die miRNA mmu-mir-712 an der Position des SNP TUM-3994. Die freie Energie für die Bindung der miRNA beträgt -27,93 kcal/mol. Eine Aussage über den Konservierungsgrad durch orthologe Sequenzen war mit dem *MicroCosmTargets*-Tool jedoch nicht möglich, da nur das bovine Gen zur Verfügung stand. Die Analyse mit *TargetScan Human* ergab keine konservierten miRNA-Bindestellen an der Position des Polymorphismus TUM-3994.

Die SNP TUM-3974 und TUM-3994 wurden mittels *TaqMan*-Assays in der HF-Population

genotypisiert und auf Assoziationen mit den Merkmalen FPro-ZW, FPro10-20 und FPR10-20 bei HF getestet. Die P-Werte der einzelnen Merkmale sind in Tabelle 4.7 aufgeführt. Die SNP aus der Resequenzierung des *GPAT4*-Gens weisen bei den Merkmalen FPro10-20 und FPR10-20 schwächere Signifikanzwerte auf als der Topmarker ARS-BFGL-NGS-57448. Für das Merkmal Fettgehalt-Zuchtwert ist der SNP TUM-3974 der signifikanteste Marker. Die Variante TUM-3994 hingegen ist bei den Analysen deutlich schwächer signifikant assoziiert als der Promotor-Polymorphismus TUM-3974. Die häufigeren Allele T ( $f(T)=0,62$ ) des SNP TUM-3974 und C ( $f(C)=0,60$ ) des SNP TUM-3994 zeigen einen positiven Effekt auf den Fettgehalt.

*Tabelle 4.7: P-Werte der bei HF genotypisierten Polymorphismen TUM-3974 und TUM-3994 im Vergleich zu dem signifikantesten Marker aus der GWAS.  $\alpha$  ist der Allelsubstitutionseffekt.*

Merkmal	TUM-3974	$\alpha$	TUM-3994	$\alpha$	ARS-BFGL-NGS-57448
FPro-ZW	$5,18 \times 10^{-5}$	0,041	$2,26 \times 10^{-4}$	0,037	$9,83 \times 10^{-5}$
FPro10-20	$9,54 \times 10^{-18}$	0,062	$2,43 \times 10^{-12}$	0,050	$1,19 \times 10^{-19}$
FPR10-20	$2,42 \times 10^{-16}$	0,032	$4,67 \times 10^{-12}$	0,027	$2,98 \times 10^{-18}$

## 4.2 Gesundheitsmerkmale und Nutzungsdauer

### 4.2.1 Genomweite Assoziationsstudien

#### 4.2.1.1 Assoziation auf BTA6 mit den Merkmalen Nutzungsdauer und Body-Condition-Score bei Holstein-Friesian

Ausgehend von den Daten der genomweiten Genotypisierung von 2327 HF-Bullen an 44.280 SNP konnte mittels Varianz-Komponenten-basiertem Ansatz in einer GWAS für die Merkmale Nutzungsdauer und Body-Condition-Score ein QTL auf BTA6 identifiziert werden (Abbildung 4.28 a und 4.28 b).

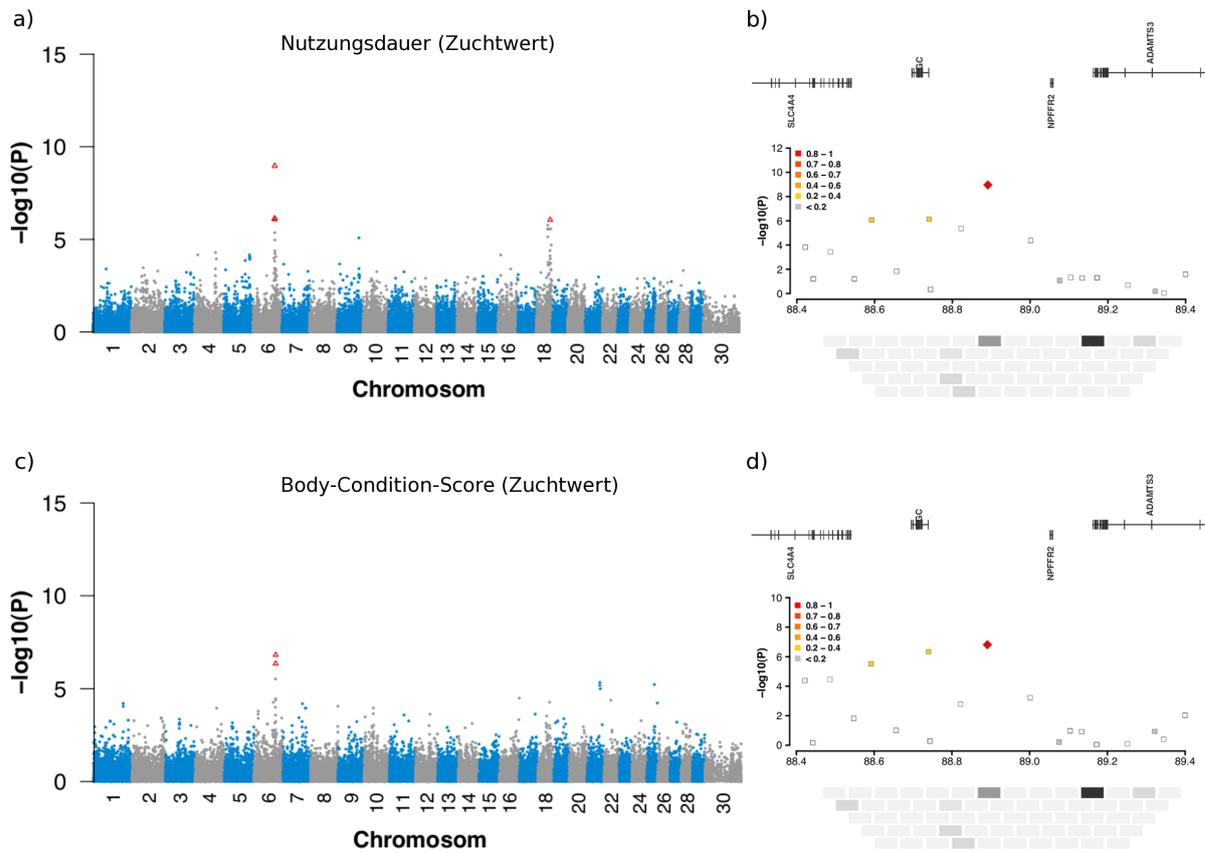


Abbildung 4.28: Manhattan-Plot der Ergebnisse aus der GWAS bei Holstein-Friesian für das Merkmal a) Nutzungsdauer und c) Body-Condition-Score. Die physikalische Position der Marker ist nach dem UMD3.1-Assembly auf der x-Achse, der negative dekadische Logarithmus der P-Werte auf der y-Achse aufgetragen. Rote Dreiecke entsprechen genomweit signifikanten SNP mit  $P < 1,13 \times 10^{-6}$  (Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze). LD-Plot des QTL auf BTA6 (88,4 - 89,4 Mb) mit den positionellen Kandidatengen für die Merkmale b) RZN und d) BCS. Die rote Raute symbolisiert den am signifikantesten assoziierten Marker. Unterschiedliche Farben der Punkte indizieren das Kopplungsungleichgewicht als  $r^2$  zwischen dem Topmarker und den anderen SNP in der abgebildeten Region. Das paarweise Kopplungsungleichgewicht der Marker ist über die verschiedenen Grautöne dargestellt.

Als Signifikanzgrenze wurde ein P-Wert von  $P = 1,13 \times 10^{-6}$  (Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze) angenommen. Der signifikanteste Marker auf BTA6 war BTB-01654826 mit einem P-Wert von  $P = 1,1 \times 10^{-9}$  (RZN) bzw.  $P = 1,54 \times 10^{-7}$  (BCS). Der bei 88.891.318 bp lokalisierte SNP ist 152 kb in 5'-Richtung vom Translationsstart des *GC*-Gens entfernt. Das durch das *GC*-Gen kodierte Vitamin-D-bindende Protein ist ein Schlüsselenzym des Vitamin-D<sub>3</sub>-Metabolismus (SPEECKAERT ET AL. 2006). Durch die hohe Relevanz der Vitamin-D-Versorgung für gesundheitliche Aspekte (HOLICK 2011) und die engen Zusammenhänge zwischen der Inzidenz von Erkrankungen und der Nutzungsdauer (WANGLER ET AL. 2009), wurde das *GC*-Gen als funktionelles Kandidatengen für die Nutzungsdauer angesehen.

**4.2.1.2 Assoziation auf BTA6 mit Gesundheits- und Leistungsmerkmalen bei Fleckvieh**

Nach der Imputation standen für die genomweiten Assoziationsstudien bei der Rasse Fleckvieh die Genotypinformationen von 658.385 SNP und 3643 Tieren zur Verfügung. Für die Merkmale Persistenz, Fitness, Bemuskelung und Milchmenge konnten signifikante Assoziationen auf BTA6 (88,7 - 88,9 Mb) identifiziert werden. Die Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze lag bei  $P=7,59 \times 10^{-8}$ . Grundsätzlich gibt es drei Bereiche mit signifikant assoziierten Markern. Der mit den Merkmalen Persistenz und Fitness am signifikantesten assoziierte SNP ist der Marker BovineHD0600024355 ( $P=6,42 \times 10^{-14}$  bzw.  $P=2,95 \times 10^{-12}$ ). Dieser Marker (Position 88.919.352 bp) ist 180 kb vom Translationsstart des *GC*-Gens entfernt und liegt in 5'-Richtung des Gens. Für das Merkmal Milchmenge weist der SNP BovineHD0600024354 den niedrigsten P-Wert mit  $P=4.08 \times 10^{-10}$  auf. Der SNP liegt ebenfalls in 5'-Richtung, mit einer physikalischen Entfernung von 152 kb zu *GC*. Der SNP BovineHD0600024297 ist am signifikantesten mit dem Merkmal Bemuskelung ( $P=4.58 \times 10^{-10}$ , Position 88.744.593 bp) assoziiert. Die Position des Markers ist 5,5 kb vom Translationsstart des *GC*-Gens entfernt und beschreibt die dritte Region auf BTA6 mit signifikanten Assoziationen.

*Tabelle 4.8: Auflistung der signifikantesten Marker auf BTA6 für die Merkmale Nutzungsdauer, Persistenz, Fitness, Bemuskelung und Milchmenge bei den Rassen HF und FV*

Merkmal	Rasse	SNP	Position (bp)	P-Wert
Nutzungsdauer	HF	BTB-01654826	88.891.318	$1,10 \times 10^{-9}$
BCS	HF	BTB-01654826	88.891.318	$1,54 \times 10^{-7}$
Persistenz	FV	BovineHD0600024355	88.919.352	$6.42 \times 10^{-14}$
Fitness	FV	BovineHD0600024355	88.919.352	$2.95 \times 10^{-12}$
Bemuskelung	FV	BovineHD0600024297	88.744.593	$4.58 \times 10^{-10}$
Milchmenge	FV	BovineHD0600024354	88.913.092	$4.08 \times 10^{-10}$

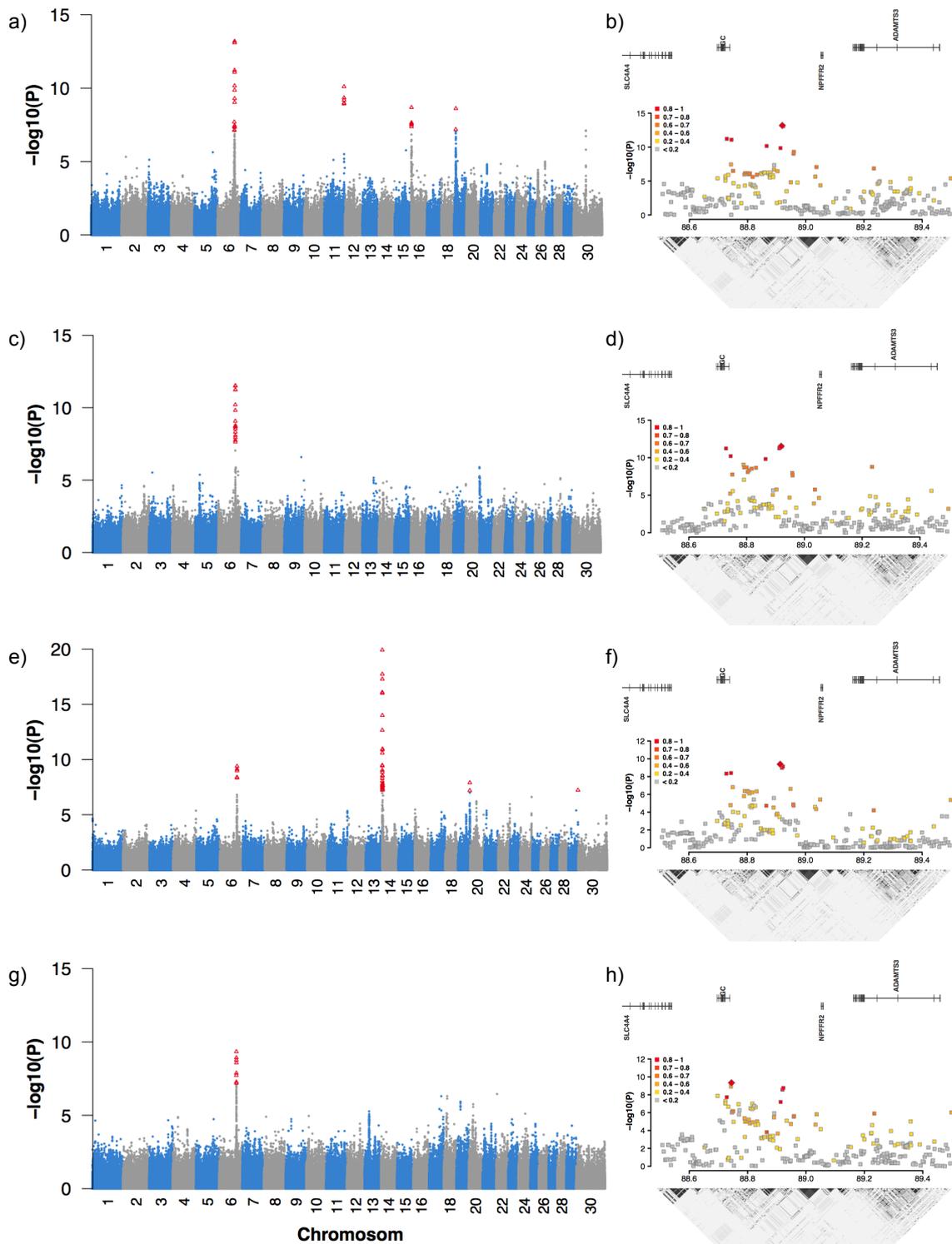


Abbildung 4.29: Manhattan-Plots und LD-Plots für die Merkmale Persistenz (a und b), Fitness (c und d), Milchmenge (e und f) und Bemuskelung (g und h) bei FV.

### 4.2.2 Korrelation der untersuchten Merkmale

Für die Merkmale, die eine Assoziation auf BTA6 gezeigt haben, wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient berechnet. Die Zuchtwerte Nutzungsdauer und BCS weisen bei der Rasse HF eine Korrelation von  $r=0,25$  auf. Bei FV wurden die Zuchtwerte für Persistenz, Fitness, Milchmenge und Bemuskelung betrachtet (Tabelle 4.9). Die stärkste Korrelation zeigen der Persistenz-Zuchtwert und der Selektionsindex (SI) Fitness mit  $r=0,35$ . Der Zuchtwert für die Bemuskelung ist mit  $r=-0,28$  negativ mit dem Zuchtwert für die Milchmenge korreliert.

Tabelle 4.9: Korrelationen der Merkmale bei FV. Dargestellt ist der Pearson'sche Korrelationskoeffizient  $r$ .

	Persistenz	Fitness	Milchmenge	Bemuskelung
Persistenz	1,00	0,35	0,10	0,09
Fitness	0,35	1,00	0,09	0,13
Milchmenge	0,10	0,09	1,00	-0,28
Bemuskelung	0,09	0,13	-0,28	1,00

### 4.2.3 Funktionale und genomische Charakterisierung des GC-Gens

#### Funktionelle Charakterisierung von GC

Das für das Protein Gruppenspezifische-Komponente kodierende Gen ist auf Chromosom 6 des Rindergenoms lokalisiert. Das Glykoprotein ist auch als Vitamin-D-bindendes Protein bekannt und nimmt eine Schlüsselrolle im Vitamin-D<sub>3</sub>-Metabolismus ein (SPEECKAERT ET AL. 2006). Die im Blut zirkulierenden Vitamin-D<sub>3</sub>-Metaboliten werden an das VDBP gebunden und zu den Zielorganen transportiert. Des Weiteren ist das Vitamin-D<sub>3</sub>-bindende Protein in die Bindung von Aktin aus lysierten Zellen sowie in Prozesse der Chemotaxis, Makrophagenregulation und Osteoklastenstimulation involviert (GOMME & BERTOLINI 2004). Zudem ist VDBP, wie das zur selben Proteinfamilie gehörende Albumin, an der Bindung ungesättigter Fettsäuren beteiligt (WILLIAMS ET AL. 1988). Die Expression des VDBP erfolgt hauptsächlich in Lebergewebe (MCLEOD & COOKE 1989; COOKE ET AL. 1991) und wird durch die Hepatozyten-Nuklearfaktoren HNF1 $\alpha$ , HNF1 $\beta$ , HNF3 und HNF4 (SONG ET AL. 1998; KIDD ET AL. 2005) und C/EBP Transkriptionsfaktoren (KIDD ET AL. 2005) reguliert. Polymorphismen im humanen GC-Gen konnten bereits mit einer veränderten Konzentration von Calcidiol (25(OH)D<sub>3</sub>) im Blutplasma in Verbindung gebracht werden (AHN ET AL. 2010; BU ET AL. 2010; GOZDZIK ET AL. 2011). Eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration von VDBP

und dem 25(OH)D<sub>3</sub> im Blutplasma konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (WINTERS ET AL. 2009). Da das Vitamin-D-bindende Protein in 20-fach höherer Konzentration als die Liganden aus dem Vitamin-D-Metabolismus vorliegt (SPEECKAERT ET AL. 2006), kommt eine Regulation auf Transkriptionsebene weniger stark zum Tragen. VDBP bindet mit einer hohen Affinität 88 % des 25(OH)D<sub>3</sub> und 85 % des 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und nimmt eine Pufferfunktion im Vitamin-D-Stoffwechsel ein (WHITE & COOKE 2000). Das VDBP ist als entscheidender Faktor für den Vitamin-D-Haushalt des Körpers anzusehen und ist auch aufgrund der nachgewiesenen Funktionen, wie beispielsweise der Aktinbindung und Makrophagenregulation (GOMME & BERTOLINI 2004), in engem Zusammenhang mit gesundheitlichen Effekten auf den Organismus zu nennen.

### Struktureller Aufbau von *GC*

Mittels lokaler BLAST-Suche der humanen cDNA-Sequenz (NM\_000583.3) gegen das UMD3.1-Assembly des Rindes konnte das *GC*-Gen auf BTA6 bei 88,7 Mb lokalisiert werden. Das Gen liegt auf dem Minus-Strang. Die Annotation mittels *GENOMETHREADER* ergab einen Aufbau aus 13 Exons, was der Genstruktur des humanen *GC* entspricht (BRAUN ET AL. 1993). Exon 13 wird nicht translatiert. Alle Intron-Exon-Grenzen folgen der AG-GT Regel als Splice-Recognition-Sites (BREATHNACH ET AL. 1978) (Tabelle 9.6). Das bovine *GC* kodiert für 474 Aminosäuren und weist einen Übereinstimmungswert von 82,0 % mit der caninen, 80,0 % mit der humanen und 72,0 % mit der murinen Proteinsequenz auf. Mittels *Neural Network Promoter Prediction* konnte der Transkriptionsstart an Position 88.739.366 bp mit einem Score von 0,95 vorhergesagt werden. Die Analyse auf ein TATA-Signal mit *HcTata* ergab bei 88.739.396 bp eine mögliche Position. Zudem konnte eine CAAT-Box 103 bp vor dem Transkriptionsstart vorhergesagt werden. CpG-Inseln in der 5'-flankierenden Region konnten über die Software *CpGPlot* nicht festgestellt werden. Für den Bereich 1217 bp vor dem Translationsstart ist im Assembly eine unbekannte Sequenzabfolge verzeichnet. Ein weiterer Bereich mit unbekannter Sequenzinformation liegt an Position 88.709.974 bis 88.710.075 bp, 94 bp vor Exon 10. Poly-A Signale wurden an den Positionen 88.695.964, 88.695.335 und 88.694.726 bp auf BTA6 identifiziert, was einer Entfernung zum Stopcodon von 5045, 5674 bzw. 6283 bp entspricht.

### Polymorphismenanalyse

In der nach der Sanger-Methode durchgeführten Resequenzierung des *GC*-Gens in 12 HF-Tieren wurden insgesamt 9870 Basen erfasst. Zusätzlich standen die Polymorphismen-Daten aus der NGS von 43 FV-Tieren zur Verfügung. In den kodierenden und flankierenden, regulatorischen Regionen konnten 62 Polymorphismen identifiziert

werden (Tabelle 9.18). Es wurden 7 SNP in der 5'-flankierenden Region, 30 in den Introns und 18 im 3'-flankierenden Bereich detektiert. In den kodierenden Abschnitten wurden die synonymen Austausche N65, D151, P152, D332 und C451 und die nicht-synonymen Polymorphismen S54G und R354Q gefunden. Diese SNP liegen ausserhalb der postulierten Vitamin-D-bindenden Domäne bei Aminosäure 35 bis 49 und der Aktin-bindenden Domäne bei Aminosäure 350 bis 403 (HADDAD ET AL. 1992). Der Vergleich zwischen den untersuchten Rassen ergab Übereinstimmungen im Auftreten der Varianten (Tabelle 9.18).

Die detektierten SNP wurden zunächst für beide Rassen getrennt auf Kopplungsungleichgewicht mit dem Topmarker BTB-01654826 für HF und BovineHD0600024355, BovineHD0600024354 und BovineHD0600024297 für FV analysiert (Abbildungen 4.30 und 4.31). Bei der Rasse HF zeigen Polymorphismen in Intron 2 (TUM-4141, TUM-4142, TUM-4143 und TUM-4144), der synonyme Austausch TUM-4146 (N65) und ein Polymorphismus in Intron 3 (TUM-4147) das stärkste LD ( $r^2=0,71$ ). Für den SNP TUM-4005 im Promotorbereich wurde ein Wert von  $r^2=0,54$  ermittelt. Die Polymorphismen TUM-4005, TUM-4006, TUM-4008 in der Promotorregion, sowie TUM-4011 in Intron 1 weisen bei der Rasse FV das stärkste Kopplungsungleichgewicht mit den Topmarkern auf (Tabelle 4.10).

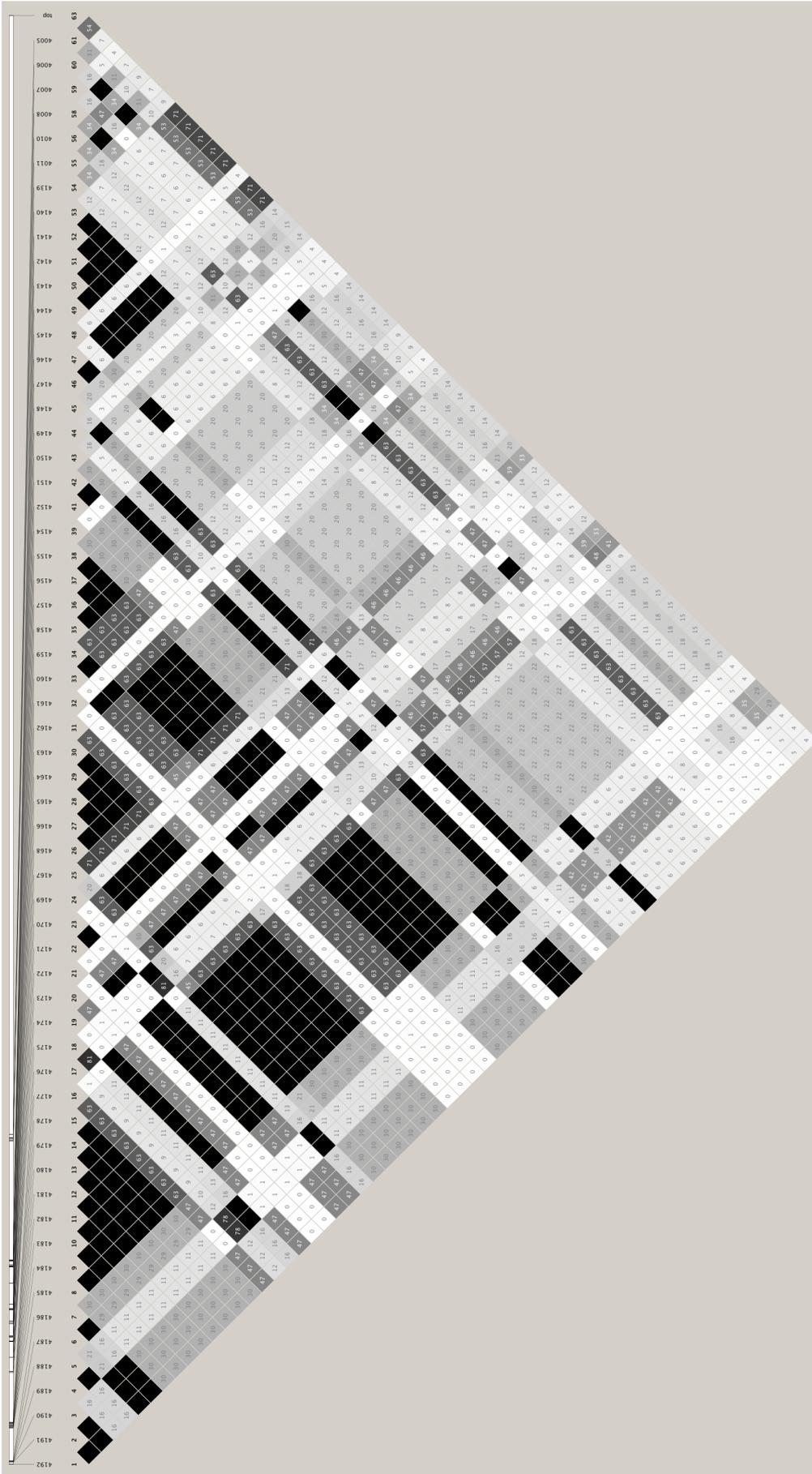


Abbildung 4.30: Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen aus der Resequenzierung des GC-Gens in HF. Das LD wurde als  $r^2$  berechnet. Die Bezeichnung „top“ steht für den signifikantesten Marker aus der GWAS BTB-01654826.

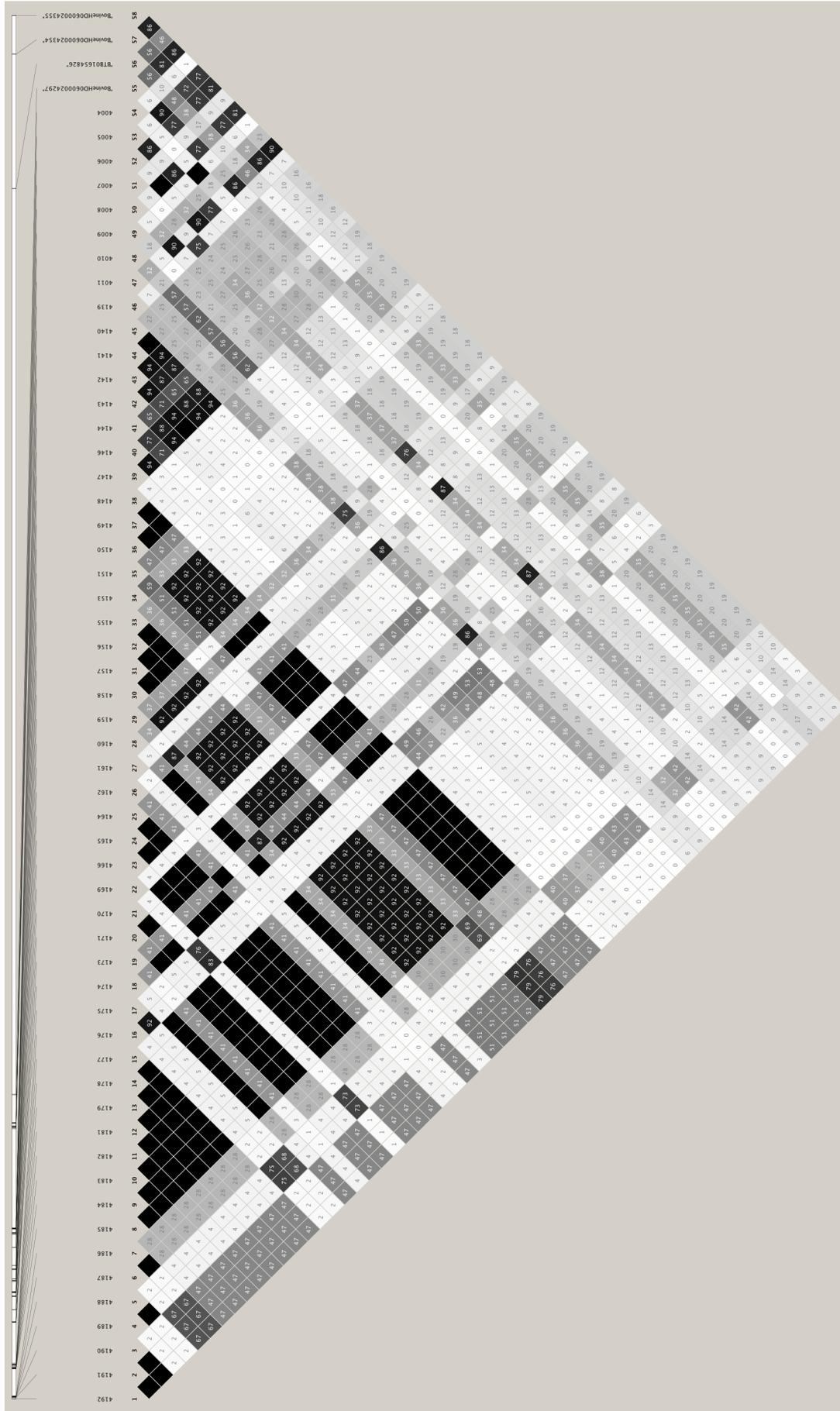


Abbildung 4.31: Kopplungsungleichgewicht der Polymorphismen aus der NGS des GC-Gens in FV. Das LD wurde als  $r^2$  berechnet.

Tabelle 4.10: LD als  $r^2$  zwischen den mittels NGS identifizierten SNP und den signifikantesten Markern aus der GWAS bei FV

Marker	TUM-4005	TUM-4006	TUM-4008	TUM-4011
BovineHD0600024355	0,77	0,81	0,81	0,90
BovineHD0600024354	0,72	0,77	0,77	0,86
BovineHD0600024297	0,90	0,77	0,77	0,86

Zur Identifizierung kausaler Varianten und für den Ausschluss falsch positiver Assoziationen wurden die Ergebnisse beider Rassen betrachtet. Daher wurden Varianten die in beiden Rassen ein hohes LD mit dem Topmarker aufweisen und mögliche funktionelle Zusammenhänge aufzeigen für weitere Analysen ausgewählt. Der SNP TUM-4005 zeigt bei beiden untersuchten Rassen ein starkes LD mit den jeweiligen Topmarkern aus den GWAS. Die Vorhersage möglicher TFBS mit *ConTra* ergab zunächst eine Bindestelle von Xvent-1. Der Transkriptionsfaktor Xvent-1 wurde in Zusammenhang mit der Embryonalentwicklung bei *Xenopus* beschrieben (GAWANTKA ET AL. 1995). Ein funktionaler Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Metabolismus erscheint nicht plausibel. Eine Analyse unter Berücksichtigung von Transkriptionsfaktoren, die bereits in Verbindung mit dem VDBP genannt wurden oder im Lebergewebe Prozesse regulieren, zeigte eine mögliche Bindestelle für das CCAAT/Enhancer-bindende Protein (C/EBP) (Abbildung 4.32). Das häufigere T-Allel von TUM-4005 (Fleckvieh  $f(T)=0,52$  bzw. Holstein-Friesian  $f(T)=0,62$ ) weist geringere Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen der Bindestelle von C/EBP als das G-Allel auf. C/EBPs sind an der Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie an verschiedenen metabolischen Prozessen in Leberzellen und Adipozyten beteiligt (RAMJI & FOKA 2002). Für das *GC*-Gen wurden bereits mögliche Bindestellen von C/EBP im Promotor vorhergesagt (KIDD ET AL. 2005). An der Transkription des für das Protein Albumin kodierenden Gens *ALB* ist C/EBP beteiligt (DESCOMBES ET AL. 1990). Da ein Vergleich zwischen dem strukturverwandten Albumin und dem Vitamin-D-bindenden Protein Ähnlichkeiten in der 5'-regulierenden Region aufzeigte (COOKE ET AL. 1991), könnte C/EBP bei der Regulation des *GC*-Gens ebenfalls eine Rolle spielen.

Der SNP TUM-4005 wurde mittels *TaqMan*-Assay in den Populationen genotypisiert. Die Genotypen der HF- und FV-Tiere aus der GWAS wurden auf Assoziation mit den Merkmalen Nutzungsdauer und Body-Condition-Score, bzw. Persistenz, Fitness, Milchmenge und Bemuskelung getestet. Der SNP TUM-4005 ( $P=7,39 \times 10^{-7}$ ) ist weniger signifikant mit dem Merkmal Nutzungsdauer bei HF assoziiert, als der SNP BTB-01654826 ( $P=1,09 \times 10^{-9}$ ). Das häufigere T-Allel ist negativ mit dem RZN assoziiert ( $\alpha=-1,86$ ). Auch bei dem Merkmal BCS weist der SNP TUM-4005 ( $P=4.50 \times 10^{-7}$ ) weniger signifikante Assoziationen auf als der Topmarker BTB-01654826 ( $P=1,54 \times 10^{-7}$ ). Das T-Allel ist positiv mit dem BCS asso-

## 4 Ergebnisse

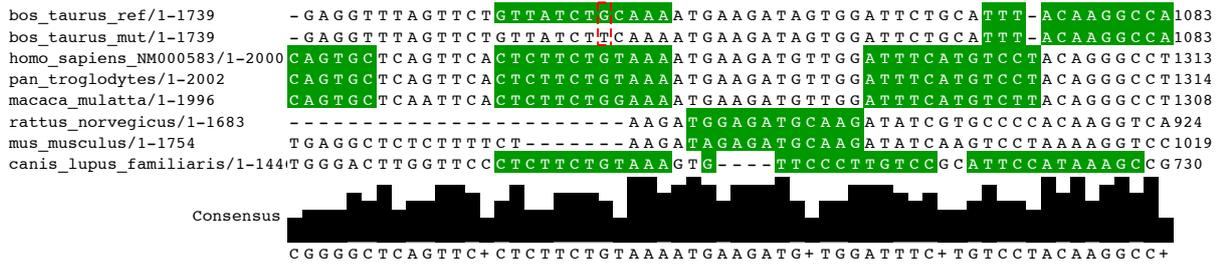


Abbildung 4.32: Vorhersage für eine mögliche Transkriptionsfaktorbindestelle für C/EBP (grün) an SNP TUM-4005 mittels ConTra unter Verwendung der TRANSFAC-Datenbank. Der Austausch TUM-4005 (G>T) ist rot-markiert. Die Höhe der schwarzen Balken der Consensus-Sequenz gibt den Grad der Konservierung an.

ziiert ( $\alpha=0,34$ ). Bei der Rasse FV ist der SNP TUM-4005 mit den Merkmalen Bemuskelung und Milchmenge ebenfalls geringer signifikant assoziiert als die entsprechenden Topmarker (Tabelle 4.11). Bei den Merkmalen Persistenz und Fitness weist der SNP TUM-4005 jedoch die niedrigsten P-Werte von allen Marken der Assoziationsstudie auf und zeigt somit die stärkste Assoziation. Das T-Allel hat einen negativen Effekt auf die Merkmale Persistenz, Fitness und Bemuskelung und einen positiven Effekt auf die Milchmenge (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11: Vergleich der P-Werte des SNP TUM-4005 und der Topmarker aus der GWAS.  $\alpha$  ist der Allelsubstitutionseffekt.

Merkmal	Rasse	P-Wert (TUM-4005)	$\alpha$	SNP	P-Wert
Nutzungsdauer	HF	$7,39 \times 10^{-7}$	-1,86	BTB-01654826	$1,09 \times 10^{-9}$
BCS	HF	$4,50 \times 10^{-7}$	+0,34	BTB-01654826	$1,54 \times 10^{-7}$
Persistenz	FV	$4,00 \times 10^{-14}$	-2,31	BovineHD0600024355	$6,42 \times 10^{-14}$
Fitness	FV	$1,12 \times 10^{-12}$	-2,29	BovineHD0600024355	$2,95 \times 10^{-12}$
Bemuskelung	FV	$1,26 \times 10^{-8}$	-1,69	BovineHD0600024297	$4,58 \times 10^{-10}$
Milchmenge	FV	$2,94 \times 10^{-9}$	+78,4	BovineHD0600024354	$4,08 \times 10^{-10}$

## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemeiner Versuchsansatz

Durch die Implementierung genomweiter Assoziationsstudien konnten in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte in der Aufklärung der genetischen Architektur komplexer Merkmale erzielt werden (z. B. HAYES ET AL. (2010)). Die gewonnenen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis ökonomisch wichtiger Leistungsmerkmale und Krankheiten bei (GODDARD 2008) und finden in der genomischen Selektion Anwendung (MEUWISSEN ET AL. 2001; FRIES & PAUSCH 2011).

In dieser Arbeit sollten die genetischen Grundlagen komplex vererbter Merkmale in GWAS aufgeklärt werden. Ziel war es, Kandidatengene in Hinblick auf die Stoffwechselsituation in der frühen Laktation über die Parameter FPro und FPR der Milch zu identifizieren sowie die Zusammenhänge zwischen Gesundheits- und Leistungsmerkmalen und Varianten des für das VDBP kodierenden *GC*-Gens zu untersuchen.

Die Verfügbarkeit hoch-erblicher Phänotypen ermöglicht die Identifizierung von QTL mit kleinen Merkmalseffekten, trotz, im Vergleich zu humanen Studien, geringen Individuenzahlen (GODDARD & HAYES 2009). Daher wurden Zuchtwerte von HF- und FV-Bullen aus der künstlichen Besamung verwendet. Die mittels BLUP geschätzten Zuchtwerte wurden in der Zuchtwertschätzung für jeden Bullen über eine große Anzahl an Nachkommen ermittelt und stellten hoch-erbliche Merkmale dar. Die GWAS wurden an einem mittelgroßen Datensatz von 2327 HF- und 3643 FV-Bullen durchgeführt. Da eine hohe Markerdichte als erforderlich für die erfolgreiche Identifizierung von QTL mit geringen bis moderaten Merkmalseffekten gilt (RISCH 2000), wurden neben den 54.001 bzw. 54.602 SNP umfassenden, mitteldichten Arrays auch hochdichte SNP-Chips mit 777.962 SNP verwendet. Über das Erfassen der Haplotypen-Diversität einer Population ist es möglich die Genotypen von mitteldicht genotypisierten Tieren *in-silico* zu hochdichten Genotyp-Datensätzen zu imputieren (LI ET AL. 2009). In dieser Arbeit wurde daher bei fehlenden Genotypinformationen auf imputierte Daten zurückgegriffen.

Nutztierpopulationen zeichnen sich häufig durch eine geringe effektive Populationsgröße mit engen Verwandtschaftsstrukturen und großen Halbgeschwisterfamilien aus (NOTTER 1999). Dadurch kann es zu systematischen Unterschieden in den Allelfrequenzen zwischen den

Subpopulationen kommen, die aufgrund von Verwandtschaftseffekten auftreten und falsch positive Assoziationen darstellen (MARCHINI ET AL. 2004). Aus diesen Gründen wurde mittels Varianz-Komponenten-basiertem Ansatz sorgfältig auf Populationsstratifikation korrigiert. Die Verwandtschaftseffekte wurden über die genomische Verwandtschaftsmatrix nach VANRADEN ET AL. (2011) berücksichtigt und in einem gemischten Modell implementiert. Für die Evaluierung der assoziierten QTL wurde eine zweite Rasse betrachtet, um weitere falsch positive Ergebnisse auszuschließen (PEARSON & MANOLIO 2008). Hierbei lies sich feststellen, dass einige QTL für das Merkmal FPro bei beiden untersuchten Rassen auftreten.

Die systematische Suche nach Polymorphismen sowie die Detektion möglicher kausaler Varianten in den Kandidatengenomen wurde mittels Sanger-Sequenzierung und NGS durchgeführt. Aufgrund der geringen effektiven Populationsgröße der untersuchten Rinderrassen (PIRCHNER 2002; KOENIG & SIMIANER 2006; PAUSCH ET AL. 2013) bestehen ausgedehnte LD-Strukturen, so dass die verwendeten Markerdichten als ausreichend angesehen wurden. Die Identifizierung möglicher kausaler Varianten erfolgte nach dem grundlegenden Prinzip der GWAS und der markergestützten Selektion über ein bestehendes Kopplungsungleichgewicht mit den signifikanten Markern (GODDARD & HAYES 2009).

Mittels Varianz-Komponenten-basiertem Ansatz wurden unter Verwendung hoch-erblicher Phänotypen für die Merkmale FPro-ZW, FPro der Laktationstage 10 bis 300, FPro10-20, FPR10-20 sowie für die Gesundheits- und Leistungsmerkmale Nutzungsdauer, Body-Condition-Score, Fitness, Persistenz, Milchmenge und Bemuskelung signifikant assoziierte QTL identifiziert.

### 5.2 Stoffwechselforgänge in der frühen Laktation

Die Phase der frühen Laktation ist geprägt durch das Auftreten der NEB und die damit einhergehende Mobilisierung von Körperfett (BELL 1995). Das Fettsäuremuster der Milch spiegelt dabei die physiologischen Vorgänge im Körper wider (STOOP ET AL. 2009; GROSS ET AL. 2011). Im späteren Verlauf der Laktation wird die Fettzusammensetzung dann maßgeblich durch die *de-novo*-Fettsynthese im Eutergewebe sowie durch Fettsäuren aus der Futteraufnahme beeinflusst (RUDOLPH ET AL. 2007). Diese Unterschiede im Fettmetabolismus sind in den verschiedenen assoziierten QTL erkennbar, die für die einzelnen Laktationsphasen identifiziert werden konnten.

Bei beiden untersuchten Rassen zeigten *GPAT4* und *DGAT1* aus der Triglycerid-Biosynthese starke Assoziationen mit dem FPro der frühen Laktation. BIONAZ & LOOR (2008b) stellten fest, dass die Expression von *GPAT4* und *DGAT1* zwischen Laktationstag

30 und 60 maximal ist. Die Ergebnisse dieser GWAS bestätigen dieses Expressionsmuster auf genetischer Ebene. Für *GPAT4* konnten Polymorphismen in regulatorischen Regionen als möglicherweise kausal identifiziert werden. Inwiefern bei *DGAT1* neben der als kausal postulierten K232A-Variante (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002) ein weiterer Polymorphismus in die Ausprägung des Merkmals FPro involviert ist, bleibt abzuklären. Anhand des Expressionsverlaufs von *DGAT1* (BIONAZ & LOOR 2008b) ist eine regulatorische Variante in Betracht zu ziehen, die in der frühen Laktation zum Tragen kommt, wohingegen im späteren Laktationsverlauf die K232A-Substitution entscheidenden Einfluss auf die Varianz des Fettgehalts hat. Dies entspricht den Ergebnissen von KÜHN ET AL. (2004), wonach dem QTL auf BTA14 mehrere Loci im *DGAT1*-Gen, unter anderem ein VNTR in einer möglichen TFBS, zugrunde liegen. Auch STRUCKEN ET AL. (2011b) stellten fest, dass der K232A-Locus erst nach Laktationstag 40 den charakteristischen Genotypeneffekt auf Milchleistungsmerkmale zeigt. Im regulatorischen Bereich des *DGAT1*-Gens konnten jedoch keine Polymorphismen identifiziert werden, die mit dem Topmarker der GWAS ein hohes LD aufweisen und einen Hinweis auf eine mögliche Kausalität geben.

Neben dem *DGAT1*-Locus konnte nach Korrektur auf die K232A-Substitution ein weiterer QTL auf BTA14 detektiert werden. Dies bestätigt die Hypothese von STRUCKEN ET AL. (2011a), dass mehrere Loci auf BTA14 einen Effekt auf Fettmerkmale haben. Das *GPIHBP1*-Gen hatte bei der Rasse HF in der frühen Laktation einen höheren Anteil an der Zuchtwert-Varianz als für den FPro-ZW und wird daher als wichtiges Kandidatengen der frühen Laktation angesehen. *GPIHBP1* fungiert als Plattform für die LPL und ist unter anderem am Transport von aus der Körperfettmobilisierung stammenden, freien Fettsäuren in die Euterzellen beteiligt (HERNELL & OLIVECRONA 1974). Der QTL auf BTA19 mit *FASN* als funktionelles und positionelles Kandidatengen wurde für Tag 15 bis 25 identifiziert. Dies beschreibt die Bedeutung der *de-novo*-Synthese in der frühen Laktation (BIONAZ & LOOR 2008b). Diese nimmt zwar relativ gesehen eine schwächere Rolle in dieser Phase der Laktation ein, ist jedoch mit Einsetzen der Milchsynthese auf dem Maximum (RUDOLPH ET AL. 2007). Die Expression von *FASN* nimmt nach Tag 60 *post partum* ab (BIONAZ & LOOR 2008b). Möglicherweise handelt es sich bei dem kausalen QTN im *FASN*-Gen ebenfalls um eine regulatorische Variante, die vor allem in der frühen Laktation den Fettgehalt entscheidend beeinflusst.

Auf BTA11 wurde bei der Rasse FV ein QTL identifiziert, der auf *PAEP* als Kandidatengen hinweist. Die signifikanteste Assoziation trat dabei zu Beginn der Laktation (Tag 15) auf. Anders als für den QTL auf BTA27 konnten in dieser Region auch für den weiteren Laktationsverlauf signifikante Assoziationen festgestellt werden. Das für das  $\beta$ -Lactoglobulin kodierende Gen wurde bereits für Protein- und andere Milchmerkmale beschrieben (BERRY ET AL. 2010; YANG ET AL. 2012).

Für die spätere Laktationsphase und für den FPro-ZW zeigten Loci auf den Chromosomen BTA5, BTA6 und BTA20 signifikante Assoziationen. Die positionellen Kandidatengene sind nicht direkt in den Fettmetabolismus involviert, weisen jedoch funktionelle Zusammenhänge auf. *EPS8* wurden Auswirkungen auf den Körperfettanteil, die Sensitivität gegenüber Insulin und den Glucosespiegel im Blut bei Knockout-Mäusen nachgewiesen (TOCCHETTI ET AL. 2010). *MGST1* ist primär in die Abwehr von oxidativem Stress involviert (MAEDA ET AL. 2005) und spielt möglicherweise eine Rolle bei der durch LPS verursachten Milchfettdepression (GOZHO ET AL. 2007). Das auf BTA6 liegende *CSN2*-Gen kodiert für das  $\beta$ -Casein und wurde als QTL für Proteinmerkmale beschrieben (VELMALA ET AL. 1995). Obwohl das Gen nicht in den Fettstoffwechsel involviert ist, zeigte dieser QTL in Studien Auswirkungen auf die Fettmenge und den Fettgehalt der Milch (BOVENHUIS ET AL. 1992; VELMALA ET AL. 1995; MAI ET AL. 2010; IKONEN ET AL. 2001). FREYER ET AL. (2003) diskutieren daher, ob es sich um pleiotrope Mechanismen oder aufgrund der starken Korrelation der einzelnen Milchleistungsmerkmale und eines bestehenden Koppungsungleichgewichts um unterschiedliche QTL handelt. Der Wachstumshormon-Rezeptor GHR auf BTA20 übermittelt die biologische Aktivität des Wachstumshormons auf die Zielzellen. Das Wachstumshormon regelt die Verteilung von Nährstoffen im Körper, so dass während der Laktation Energie für die Milchsynthese bereitgestellt wird (LUCY ET AL. 2001).

Die variierenden assoziierten QTL der verschiedenen Phasen entsprechen den physiologischen Abläufen der Laktation. Dennoch fällt es schwer genaue Aussagen über die beteiligten Stoffwechselprozesse zu treffen, da es sich bei dem Merkmal FPro um ein quantitatives Merkmal handelt (HAYES ET AL. 2010) und eine Vielzahl an Genen in einem komplexen Netzwerk an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt ist (BIONAZ & LOOR 2008b). Die durchgeführte Assoziationstudie bestätigt dies und zeigt, dass die Laktationsphase ein nicht unwesentlicher Faktor bei der Identifizierung von mit dem Fettgehalt assoziierten Genen ist.

### 5.3 Verwendung des Merkmals Fettgehalt als Parameter für den Stoffwechselzustand

BUTTCHEREIT ET AL. (2011) schlagen das FPR als geeigneten Parameter für das Ausmaß der NEB und den Umgang mit der Stoffwechselbelastung der frühen Laktation vor. Die Heritabilität des FPR weist hohe Werte auf ( $h^2=0,69$ ) (MEINERT ET AL. 1989) und zeigte bei HF-Kühen bis Laktationstag 35 Wiederholbarkeiten über 0,60 (BUTTCHEREIT ET AL. 2010). Dies deutet darauf hin, dass dem Umgang mit der Stoffwechselbelastung in der Phase der NEB eine genetische Komponente zugrunde liegt. In GWAS konnten

### 5.3 Verwendung des Merkmals Fettgehalt als Parameter für den Stoffwechselzustand

---

für das FPR10-20, wie auch für den FPro10-20, assoziierte QTL auf BTA14 und BTA27 identifiziert werden. Die positionellen Kandidatengene *DGAT1*, *GPIHBP1* und *GPAT4* sind Schlüsselenzyme des Fettmetabolismus und bestätigen die Hypothese eines genetischen Effekts. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der GWAS für das FPR10-20 und den FPro10-20 zeigt, dass beiden Merkmalen dieselben Loci zugrunde liegen. Die Korrelation zwischen dem aus den Zuchtwerten berechneten FPR und dem FPro ist sehr hoch ( $r=0,987$ ), während der Proteingehalt (PPro) nur vergleichsweise schwache Korrelationen zeigt ( $r=-0,029$ ). VOS & GROEN (1998) stellten ebenfalls eine deutlich stärkere Korrelation des FPR mit dem Fettgehalt als mit dem Proteingehalt fest. Das FPR wird demzufolge hauptsächlich über den Fettgehalt beeinflusst, vor allem wenn es wie in dieser Studie als Zuchtwert ermittelt wird. In der frühen Laktation spiegelt der Fettgehalt der Milch, wie auch das FPR, die Menge an mobilisiertem Körperfett wider. Ein hoher Fettgehalt deutet dabei auf eine übermäßige Mobilisierung von Körperfett und einen nicht adäquaten Umgang mit der Stoffwechselbelastung der frühen Laktation hin (DE VRIES & VEERKAMP 2000).

Grundsätzlich sollte bei der Verwendung von Phänotypen, die auf einzelnen Phänotyp-Erhebungen basieren, großes Augenmerk auf die Qualität der Daten gelegt werden, um assoziierte QTL erfolgreich zu identifizieren (BARENDSE 2011). Die in dieser Studie verwendeten Phänotypen sind Zuchtwerte, die über eine große Anzahl an Nachkommen ermittelt wurden. Diese stellen jedoch indirekte Parameter für den Stoffwechselstatus in der frühen Laktation dar. Es handelt sich um hoch-erbliche Merkmale, die weniger stark durch Umwelteffekte beeinflusst sind (GODDARD & HAYES 2009). Die analysierten Marker der GWAS erklärten bei HF 81 % der Zuchtwert-Varianz des FPro10-20 und bei FV 89 % der Zuchtwert-Varianz des FPro20. Aufgrund der hohen Korrelation zwischen dem FPR10-20 und dem FPro10-20 und der hohen Heritabilität des Merkmals FPro-ZW (WADE & VLECK 1989; PANDER ET AL. 1992; STOOP ET AL. 2008) wurde der Fettgehalt für die Charakterisierung des Stoffwechselzustandes gewählt. Es ist jedoch zu beachten, dass nicht der klassische FPro-ZW verwendet wurde, sondern der aus den einzelnen Testtagen der frühen Laktation berechnete FPro. Auch BUTTCHEREIT ET AL. (2010) stellten fest, dass die Wiederholbarkeit der Ergebnisse und die Korrelation zwischen der Energiebilanz und dem FPR im Laufe der Laktation abnimmt. In dieser Studie zeigten die GWAS unterschiedliche QTL für den FPro-ZW und für die Phase der frühen Laktation, die diese Unterschiede der Laktationsphasen aufgreifen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der FPro-ZW als Integral über die gesamte Laktation zu sehen ist, da er maßgeblich über QTL bestimmt wird die in der späteren Laktation (nach Tag 50) die Varianz entscheidend beeinflussen. In der Phase der NEB hingegen sind andere QTL entscheidend.

### 5.4 Vergleich der signifikant assoziierten QTL mit den Ergebnissen anderer Assoziationsstudien für das Merkmal Fettgehalt

Die in dieser Arbeit für das Merkmal FPro identifizierten QTL entsprechen zu einem großen Teil bereits postulierten QTL. *DGAT1* konnte als wichtigstes Gen für den Milchfettgehalt bestätigt werden (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002; SCHENNINK ET AL. 2007). Zusätzlich wurde die Bedeutung von *DGAT1* in der frühen Laktation aufgezeigt. *DGAT1* hat bei HF und FV sowohl in der frühen Laktation, als auch bei dem Fettgehalt-Zuchtwert den größten Anteil an der Zuchtwert-Varianz. Dennoch erklärt der Locus auf BTA14 vor Laktationstag 40 deutlich weniger Varianz als im späteren Verlauf. Dies entspricht den Ergebnissen von STRUCKEN ET AL. (2011b), wonach die K232A-Variante bei HF erst ab Laktationstag 40 den charakteristischen Effekt auf Leistungsmerkmale zeigt. Zudem konnte auf BTA14 ein weiterer QTL entdeckt werden, der die von STRUCKEN ET AL. (2011a) aufgestellte Hypothese von einem zusätzlichen Locus auf diesem Chromosom bekräftigt.

Die bereits beschriebenen QTL auf BTA6 (BOVENHUIS ET AL. 1992; VELMALA ET AL. 1995; MAI ET AL. 2010; IKONEN ET AL. 2001) und BTA20 (BLOTT ET AL. 2003) sowie der bei FV neu identifizierte Locus auf BTA5 zeigen starke Abhängigkeiten von der Laktationsphase. Der QTL auf BTA5 entspricht möglicherweise dem von HAYES ET AL. (2010) bei australischen HF postulierten Locus. JIANG ET AL. (2010) konnten auf BTA11 einen QTL identifizieren, der Assoziationen mit dem FPro zeigte. Die signifikantesten Marker lagen auf Basis des Btau4.0-Assemblies bei 106 Mb und damit in Nähe des in dieser Studie als Kandidatengen angesehenen *PAEP*-Gens.

Die direkt in den Fettstoffwechsel involvierten Gene *GPAT4* und *FASN* weisen in der frühen Laktation signifikante Assoziationen mit dem FPro auf. Dabei konnte der QTL auf BTA27 durch den Vergleich der untersuchten Rassen bestätigt werden. STRUCKEN ET AL. (2012) stellten auf BTA27 einen QTL für den Fettgehalt (bis Laktationstag 60) bei HF fest, der auf *GPAT4* als Kandidatengen hindeutet. Auch BOUWMAN ET AL. (2011) beschrieben einen QTL auf BTA27 in der Region des *GPAT4*-Gens, der signifikante Assoziationen mit mittellangkettigen Fettsäuren in der niederländischen HF-Population zeigte. Die Funktion von *GPAT4*, Fettsäuren an die zweite Position des Glycerols zu verestern (BIONAZ & LOOR 2008b), in Verbindung mit der Häufigkeit von C14:0 und C16:0 Fettsäuren an dieser Position (JENSEN 2002) indiziert eine große Bedeutung für *GPAT4* für die Vorgänge in der frühen Laktation. Denn gerade diese Fettsäuren sind in der frühen Laktation zu einem großen Anteil im Milchfett enthalten, da sie aus der Körperfettmobilisierung stammen (GROSS ET AL. 2011).

Die Zusammenhänge zwischen QTL und dem Fettgehalt der frühen Laktation sowie über den gesamten Laktationsverlauf wurden in GWAS bislang kaum betrachtet. STRUCKEN ET AL.

(2012) führten GWAS mit Zuchtwerten für Milchleistungsmerkmale der frühen Laktation (bis Tag 60) durch und konnten, unter anderem auch für den Fettgehalt, assoziierte QTL identifizieren. Eine eingehendere Analyse zum Auffinden kausaler Varianten wurde jedoch nicht durchgeführt. Auf Transkript-Ebene konnten BIONAZ & LOOR (2008b) die genetischen und physiologischen Abläufe in der kritischen Phase nach dem Abkalben erfassen. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stellen ein Bindeglied zwischen den oben genannten Studien dar, da durch die Kombination von GWAS mit NGS-Daten mögliche kausale Varianten identifiziert werden konnten und diese wiederum in engem Zusammenhang mit regulatorischen Effekten stehen. Dennoch besteht, auch aufgrund der Komplexität der Stoffwechselprozesse in der frühen Laktation, weiterhin Forschungsbedarf.

### 5.5 Genetische Architektur des Merkmals Fettgehalt

Der Milchfettgehalt wird als prototypisches Beispiel für quantitativ vererbte Merkmale beim Rind beschrieben (HAYES ET AL. 2010). Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die komplexe genetische Architektur. Bei den untersuchten Rassen HF und FV wurden insgesamt neun QTL identifiziert, für die über funktionelle Charakteristika plausible Kandidatengene bestätigt werden konnten. Dabei zeigte sich, dass die Laktationsphase einen entscheidenden Einfluss darauf hat, wieviel der additiv-genetischen Varianz auf die einzelnen QTL entfällt. Die QTL, die eine signifikante Assoziation aufweisen, erklären aufsummiert nur einen Teil der additiv-genetischen Varianz. Einige Chromosomen haben dabei einen nennenswerten Anteil an der Varianz, ohne dass jedoch ein QTL mit genomweiter Signifikanz identifiziert werden konnte. Dies wird als typisch für ein komplex vererbtes, quantitatives Merkmal angesehen (HAYES ET AL. 2010; PIMENTEL ET AL. 2011b).

Grundsätzlich kann die Identifizierung von QTL mit geringen Merkmalseffekten durch die Verwendung eines größeren Tierdatensatzes und einer höheren Markerdichte verbessert werden (RISCH 2000; GODDARD & HAYES 2009). Die genetische Architektur eines Merkmal beeinflusst jedoch maßgeblich die Wahrscheinlichkeit der Detektion kausaler QTL, so dass auch bei einem großen Probensatz die Aufklärung aller beteiligten QTL eingeschränkt sein kann (CHAMBERLAIN ET AL. 2007). In dieser Studie könnte die nähere Betrachtung von Chromosomen mit nennenswertem Anteil an der additiv-genetischen Varianz einen Hinweis auf QTL liefern, die aufgrund der statistischen Power nicht identifiziert wurden. So wurde bei der Rasse HF auf Chromosom BTA11 ein größerer Anteil an erklärter Zuchtwert-Varianz (2,98 %) jedoch keine signifikante Assoziation für den FPro-ZW festgestellt. Bei FV hingegen wurde ein QTL als signifikant assoziiert detektiert, obwohl der Anteil an erklärter Varianz mit 3,07 % ähnlich hoch wie bei HF ist. Ein vergleichbares Bild zeigt sich für BTA19. Die Kandidatengene *PAEP* und *FASN* könnten auch bei HF kausale QTL

des Merkmals Fettgehalt darstellen und zur durch BTA11 und BTA19 erklärten Varianz beitragen. Zudem wurden diese Gene bereits in Zusammenhang mit dem Milchfettgehalt genannt (MORRIS ET AL. 2007; BERRY ET AL. 2010; YANG ET AL. 2012). Für die Rasse FV konnten insgesamt mehr assoziierte QTL für den FPro identifiziert werden, als für HF. In den GWAS bei FV wurde eine höhere Tierzahl und Markerdichte verwendet. Der QTL auf BTA27 mit dem Kandidatengen *GPAT4* wurde bei HF hingegen auch mit dem FPro-ZW als assoziiert identifiziert, während bei FV keine signifikante Assoziation mit dem FPro-ZW erfasst wurde. Dies bestätigt, dass die verwendeten Markerdichten, die Anzahl untersuchter Tiere, die LD-Struktur und Unterschiede bei der Erfassung der Phänotypen einen entscheidenden Einfluss auf das Auffinden assoziierter Loci in GWAS haben können (RISCH 2000; GODDARD & HAYES 2009; BARENDSE 2011).

### 5.6 Kausalität der Polymorphismen in *GPAT4* und *GPIHBP1*

Das auf BTA14 identifizierte Kandidatengen *GPIHBP1* bindet an die LPL und wirkt als Plattform für die Hydrolyse von Triglyceriden (SONNENBURG ET AL. 2009). Es wurde bereits in Zusammenhang mit dem Fettanteil in der humanen Milch und einer veränderten Fettsäure-Zusammensetzung beschrieben (OLIVECRONA ET AL. 2010). Für die über das LD mit dem signifikantesten Marker der GWAS ausgewählte Variante TUM-4128 konnte ein Einfluss auf die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB vorhergesagt werden. Es wurden jedoch keine signifikanten Assoziationen für diesen SNP mit dem FPro nachgewiesen, so dass eine Kausalität als nicht wahrscheinlich erscheint. Da für die Rasse Fleckvieh eine Korrektur auf die K232A-Substitution in *DGAT1* aufgrund des Vorhandenseins multipler Haplotypen (WINTER ET AL. 2002) nicht möglich war, konnte dieser QTL nicht über den Vergleich mit einer anderen Rasse evaluiert werden. Inwiefern andere Varianten im *GPIHBP1*-Gen einen kausalen Einfluss auf den FPro der Milch haben, konnte nicht geklärt werden. Aufgrund der hohen Konservierung der Aminosäuresequenz und postulierter schwerwiegender Erkrankungen bei nicht-synonymen Austauschungen (FRANSSEN ET AL. 2010; OLIVECRONA ET AL. 2010; BEIGNEUX ET AL. 2009; CHARRIÈRE ET AL. 2011) sind regulatorische Varianten zu erwarten.

Der QTL auf BTA27 mit dem Kandidatengen *GPAT4* zeigte vor allem in der frühen Laktationsphase eine signifikante Assoziation mit dem Merkmal FPro. Während bei der Rasse HF auch beim Merkmal FPro-ZW eine signifikante Assoziation auf BTA27 detektiert wurde, war der QTL bei der Rasse FV ausschließlich in der frühen Laktation bis Tag 50 signifikant assoziiert. Die identifizierten Polymorphismen, die als mögliche kausale Varianten angesehen werden können, sind in regulatorischen Regionen von *GPAT4* lokalisiert. Das Expressionsprofil von *GPAT4* zeigt eine hohe Transkriptionsrate in den ersten 60 Tagen

der Laktation (BIONAZ & LOOR 2008b). Gerade in der frühen Laktation, in der Phase der stärksten Expression dieses Gens, würden sich Varianten, die in regulatorischen Regionen liegen, möglicherweise stärker auf die Aktivität von GPAT4 und damit auf den FPro der Milch auswirken. Der Polymorphismus TUM-3974 liegt in einer vorhergesagten Bindestelle für die Transkriptionsfaktoren CREB und PPAR $\alpha$ :RXR $\alpha$ . CREB ist ein zellulärer Transkriptionsfaktor der unter anderem an Adipozyten-spezifische Promotoren bindet und die Transkription von Genen des Fettstoffwechsels (KIM ET AL. 2010) und der Gluconeogenese (CHAKRAVARTY ET AL. 2005) reguliert. CREB wird mit Prozessen der Adipogenese in Verbindung gebracht, indem es die Differenzierung (REUSCH ET AL. 2000) und Apoptose von Adipozyten steuert (REUSCH & KLEMM 2002). Bei CREB-mutierten Mäusen konnten Störungen der Laktationsfähigkeit beobachtet werden (MANTAMADIOTIS ET AL. 2006). Der Transkriptionsfaktor PPAR $\alpha$  ist in die Regulation von Genen des Fettstoffwechsels involviert und wurde bereits für Gene der Triglyceridsynthese, wie *AGPAT6* beschrieben (RAKSHANDEHROO ET AL. 2010). Die vorhergesagten Transkriptionsfaktoren zeigen funktionelle Zusammenhänge, dennoch konnten die TFBS lediglich *in-silico* bestimmt werden, so dass es sich möglicherweise um falsch positive Ergebnisse handelt. Für die Überprüfung der Kausalität der regulatorischen Variante wären Expressionsstudien erforderlich, die im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt werden konnten.

## 5.7 Zusammenhänge zwischen Vitamin-D<sub>3</sub> und Gesundheitsmerkmalen beim Rind

Die Versorgung mit Vitamin-D<sub>3</sub> hat maßgeblichen Einfluss auf die Gesundheit von Säugetieren. So konnten beim Menschen Zusammenhänge zwischen einer Vitamin-D-Unterversorgung und der Inzidenz von Erkrankungen wie Rachitis, Osteoporose, Bluthochdruck und Infektionskrankheiten festgestellt werden (HOLICK 2007; HOLICK & CHEN 2008). Auch beim Rind wurde die Bedeutung von Vitamin-D für das Immunsystem beschrieben (REINHARDT & HUSTMYER 1987). Die Präsenz des Assoziationssignals auf BTA6 nahe des *GC*-Gens für die Merkmale Fitness und Persistenz sowie Nutzungsdauer und Body-Condition-Score indiziert eine mögliche wichtige Bedeutung von Vitamin-D<sub>3</sub> für Gesundheitsmerkmale beim Rind. Das durch das *GC*-Gen kodierte Vitamin-D-bindende Protein wird als eines der Schlüsselenzyme für den Vitamin-D<sub>3</sub>-Metabolismus im Körper angesehen (SPEECKAERT ET AL. 2006). Das VDBP nimmt eine entscheidende Rolle ein, indem es an die Metaboliten des Vitamin-D-Stoffwechsels bindet und diese zu den Zielorganen transportiert (SPEECKAERT ET AL. 2006). Die dieser Studie zugrunde liegende Hypothese war, dass der identifizierte QTL auf BTA6 auf kausale Polymorphismen im *GC*-Gen hindeutet und diese eine gesundheitliche Relevanz aufweisen.

Für die einzelnen Merkmale erscheint das *GC*-Gen zunächst nicht als direktes funktionelles Kandidatengen. Bei einer genaueren Betrachtung der Merkmale können allerdings gesundheitliche Aspekte aufgedeckt werden. Die Nutzungsdauer ist zwar primär durch die Milchleistung geprägt (ESSL 1998), WÄNGLER ET AL. (2009) konnten jedoch einen starken Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Erkrankungen und der Abgangswahrscheinlichkeit von Milchkühen feststellen. Der SI Fitness berücksichtigt hauptsächlich gesundheitliche Parameter und stellt sich unabhängiger von der Leistung als der Zuchtwert Nutzungsdauer dar (FÜRST & FÜRST-WALTL 2006). Für die züchterische Verbesserung der Gesundheit und der leistungsunabhängigen Nutzungsdauer ist die Fitness in den Gesamtzuchtwert integriert. EGGER-DANNER ET AL. (2012) konnten nachweisen, dass sich eine stärkere Gewichtung von Fitness-Merkmalen bei der Zuchtwertschätzung positiv auf Gesundheitsmerkmale und auch auf ökonomische Aspekte auswirkt und somit dem negativen gesundheitlichen Trend in der Milchviehhaltung (OLTENACU & ALGERS 2005) entgegengewirkt werden kann. In die Schätzung des Fitness-Wertes gehen unter anderem Fruchtbarkeitsmerkmale, die Eutergesundheit, die Nutzungsdauer und die Persistenz ein. Die Persistenz wiederum beschreibt das Durchhaltevermögen der Milchleistung über den Laktationsverlauf (COLE & VANRADEN 2006). Bei der Rasse FV wird für die Ermittlung der Persistenz die Abweichung der individuellen Zuchtwertkurve für die Fett-Eiweiß-korrigierte Milchleistung eines Tieres zwischen den Laktationstagen 60 und 300 von einer unverändert hohen Zuchtwertkurve ab Laktationstag 60 betrachtet ([www.lfl.bayern.de/itz/rind/07584/](http://www.lfl.bayern.de/itz/rind/07584/)). Eine hohe Persistenz ist nicht nur aus ökonomischer Sicht vorteilhaft, sondern sie wurde auch als positiv für Gesundheits- und Fruchtbarkeitsaspekte beschrieben (DEKKERS ET AL. 1998). Da der Persistenz-Zuchtwert in die Berechnung des SI Fitness miteinbezogen wird, sind beide Merkmale in der untersuchten Population korreliert ( $r=0,35$ ). Der QTL auf BTA6 für den Selektionsindex Fitness tritt möglicherweise aufgrund der Korrelation zwischen Fitness und Persistenz auf. Auch für die Merkmale Bemuskelung und Body-Condition-Score könnte sich eine funktionelle Verbindung zum Vitamin-D-Haushalt ergeben. Eine Unterversorgung mit Vitamin-D<sub>3</sub> kann zu Muskelschwäche und höheren Fettanteilen in der Muskulatur führen (WARD ET AL. 2009; GILSANZ ET AL. 2010). Für den BCS wurden bereits Zusammenhänge mit Gesundheitsmerkmalen, wie z. B. der Inzidenz von Mastitis und Stoffwechselerkrankungen, beschrieben (LOKER ET AL. 2012).

Die Assoziation auf BTA6 wurde bei vier Merkmalen mit gesundheitlichen Hintergründen und zwei Rinder-Populationen identifiziert, wodurch auf einen existenten Effekt dieses QTL rückgeschlossen werden kann. Das Gen *GC* erscheint als positionelles Kandidatengen mit plausiblen funktionellen Zusammenhängen. Bislang beschränkten sich Studien beim Rind größtenteils auf die Untersuchung der Supplementierung von Vitamin-D (WILKENS ET AL. 2012; CARNAGEY ET AL. 2008) und der Folgen akuter Mangelzustände (DOBSON & WARD 1974; HIBBS & CONRAD 1976; HORST ET AL. 1994). Beim Menschen hingegen wird

zunehmend eine subklinische Unterversorgung von Vitamin-D<sub>3</sub> in Verbindung mit diversen Erkrankungen gebracht (CIANFEROTTI & MARCOCCI 2012) und auf genetische Zusammenhänge überprüft (z. B. AHN ET AL. (2010); BU ET AL. (2010); GOZDZIK ET AL. (2011)). Der Nachweis über direkte Phänotypen, wie z. B. der Vitamin-D-Gehalt im Blut, gestaltet sich dabei schwierig, da diese sehr stark durch Umwelteffekte beeinflusst werden (HOLICK 2007). In dieser Arbeit wurden Zuchtwerte verwendet, da sie Nachkommen-geprüfte hoch-erbliche Merkmale sind, Umwelteffekte minimiert sind und sie möglicherweise gesamtgesundheitliche Aspekte besser erfassen. Dennoch stellen die als Zuchtwerte vorliegenden Merkmale lediglich indirekte Parameter für die Gesundheit dar. Für eine Bestätigung sind weiterführende Studien nötig, in denen die Zusammenhänge zwischen dem VDBP und den Zuchtwerten aufgeklärt werden. Die Verwendung der assoziierten Marker aus der GWAS in der genomischen Selektion würde, ungeachtet ob es sich bei *GC* um das dem QTL zugrunde liegende kausale Gen handelt, zu einer Verbesserung der Gesundheitsmerkmale führen.

### 5.8 Assoziation zwischen dem Merkmal Milchmenge und dem QTL auf BTA6

Bei dem Merkmal Milchmenge handelt es sich um ein Leistungsmerkmal aus der Zuchtwertschätzung ohne direkten gesundheitlichen Bezug. WALLIS (1938) beschrieb zwar einen Leistungseinbruch bei Milchkühen mit akutem Vitamin-D Mangel, das positiv mit Gesundheitsmerkmalen assoziierte Allel ist in dieser Studie jedoch negativ mit dem Zuchtwert für das Merkmal Milchmenge assoziiert. Dies steht widersprüchlich zu der beschriebenen, negativen Auswirkung einer Vitamin-D-Unterversorgung auf die Gesundheit und die Leistung (WALLIS 1938). Die Korrelation zwischen den Merkmalen Persistenz und Milchmenge ist in der untersuchten Population gering ( $r=0,10$ ), so dass der Effekt des QTL auf BTA6 vermutlich nicht auf korrelative Strukturen zurückzuführen ist. Bei Betrachtung der Funktionsweise des VDBP erscheint eine pleiotrope Wirkung durch Varianten des *GC*-Gens als nicht wahrscheinlich. Dem Phänotyp Milchmenge liegt jedoch eine komplexe genetische Architektur mit zahlreichen postulierten QTL zugrunde (KHATKAR ET AL. 2004), so dass eine Funktionalität von *GC* nicht komplett auszuschließen ist. Für die einzelnen Merkmale wurden in der GWAS unterschiedliche Topmarker identifiziert, die im LD ( $r^2>0,70$ ) liegen. Dies indiziert, dass den verschiedenen Zuchtwerten unterschiedliche Loci auf BTA6 zugrunde liegen, die assoziierten SNP und kausalen Varianten jedoch einen Haplotyp bilden, der sich auf Gesundheitsmerkmale und die Milchmenge gegensätzlich auswirkt. Grundsätzlich stehen sich Leistungs- und Gesundheitsmerkmale häufig negativ korreliert gegenüber (VEERKAMP ET AL. 2003). Dies bringt eine gewisse Problematik für die genomische Selektion mit sich, da sich bei der Selektion auf Gesundheit eine negative

Tendenz für die Milchleistung ergeben würde. SODELAND ET AL. (2011b) beschrieben einen Locus für das Auftreten klinischer Mastitis bei norwegischem Rotvieh auf BTA6, der in unmittelbarer Nähe zum *GC*-Gen lokalisiert ist. Als kausales Kandidatengen wurde *Interleukin-8* postuliert. Dabei wurde in der Population ein Haplotyp identifiziert, der das *GC*-Gen überspannt und einen gegensätzlichen Effekt zwischen der Proteinmenge und der Eutergesundheit aufweist (SODELAND ET AL. 2011a). Die Zuchtwerte für die Milchmenge waren in der untersuchten FV-Population stark mit den Zuchtwerten für die Proteinmenge korreliert ( $r=0,89$ ). Auf BTA6 wurden bereits QTL für die Proteinmenge und auch die Milchmenge beschrieben (BOVENHUIS & WELLER 1994; DAETWYLER ET AL. 2008; HECK ET AL. 2009; PIMENTEL ET AL. 2011a) (Abbildung 5.1). Möglicherweise ist die Assoziation bei 88,9 Mb lediglich auf LD-Effekte mit bekannten QTL zurückzuführen. Das bovine Chromosom 6 gibt schon seit langem Anlass zu Untersuchungen inwiefern die assoziierten QTL verschiedener Leistungsmerkmale durch Haplotypen-Effekte, Pleiotropie oder unabhängige Loci bedingt sind (SPELMAN ET AL. 1996; FREYER ET AL. 2003). Die Ergebnisse dieser Studie erweitern diese Diskussion um eine gesundheitliche Komponente.

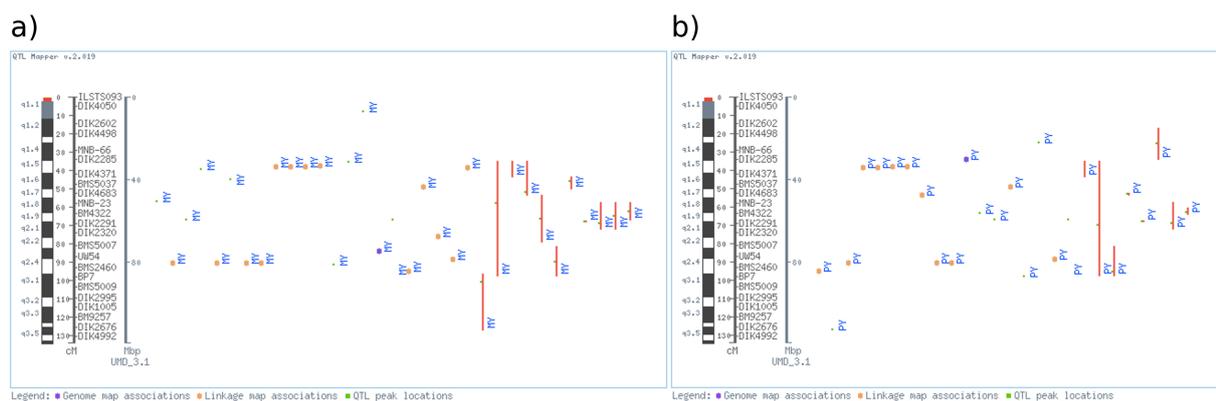


Abbildung 5.1: Identifizierte und publizierte QTL auf BTA6 für das Merkmal a) Milchmenge (MY) und b) Proteinmenge (PY). (CattleQTLdatabase: <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>).

### 5.9 Kausalität der identifizierten Varianten im *GC*-Gen

Die signifikant assoziierten SNP der GWAS sind auf zwei Bereiche in der Genregion von *GC* verteilt. Die signifikantesten SNP liegen 180 bis 5 kb in 5'-Richtung des Gens sowie in Intron 1. AHN ET AL. (2010) und BU ET AL. (2010) konnten beim Menschen bereits Assoziationen zwischen Polymorphismen in Intron 1 und dem 25-Hydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel feststellen. In diesen Studien wurden die SNP rs222020 und rs2298849 als nicht-kausal angesehen und vermutet, dass diese mit der kausalen Variante im LD liegen.

Die Promotorvariante TUM-4005 weist signifikante Assoziationen mit den untersuchten Phänotypen auf, jedoch bei den Merkmalen Nutzungsdauer und BCS bei HF sowie bei Bemuskelung und Milchmenge bei FV mit geringerer Signifikanz als die Topmarker. Der SNP TUM-4005 liegt im 5'-flankierenden Bereich und hat möglicherweise regulatorische Auswirkungen auf die Genexpression. Es konnte eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor C/EBP vorhergesagt werden. Das CCAAT/Enhancer-bindende Protein wurde bereits in Zusammenhang mit der Expression von *GC* (KIDD ET AL. 2005) und dem strukturverwandten Albumin (COOKE ET AL. 1991) beschrieben. Für eine Bestätigung des regulatorischen Effekts von TUM-4005 sind weitere Analysen erforderlich.

Da das Vitamin-D-bindende Protein in 20-fach höherer Konzentration als die Liganden aus dem Vitamin-D-Metabolismus vorliegt (SPEECKAERT ET AL. 2006), kommt eine Regulation auf Transkriptebene weniger stark zum Tragen. Auf genetischer Ebene könnten vielmehr verschiedene Varianten des VDBPs aufgrund von Varianten im kodierenden Bereich des *GC*-Gens das Auftreten von Variation im 25(OH)D<sub>3</sub>-Gehalt verursachen (LAURIDSEN ET AL. 2005; MCGRATH ET AL. 2010). Die Kausalität der detektierten Polymorphismen konnte nicht eindeutig geklärt werden. Für die Aufklärung der genetischen Effekte der identifizierten Varianten wäre die Implementierung direkter Phänotypen, wie z. B. die Expression des *GC*-Gens und die Konzentration des VDBP, sinnvoll.

### 5.10 Verwendung von Zuchtwerten als indirekte Phänotypen

Die in dieser Studie implementierten Zuchtwerte stellen indirekte Parameter für die untersuchten Stoffwechsel- und Gesundheitsmerkmale dar. Zwischen dem bekannten Effekt von Vitamin-D auf die Gesundheit (HOLICK 2011) und den Gesundheits-assoziierten Merkmalen, wie z. B. Nutzungsdauer und Fitness, konnte ein funktioneller Bezug hergestellt werden. Diese Merkmale sind jedoch als in hohem Maße indirekt anzusehen, wenn es um die Beurteilung der Kausalität von Varianten des assoziierten Kandidatengens *GC* geht. Dem Fettgehalt und Fett-Protein-Verhältnis wurden bereits Zusammenhänge mit der Stoffwechselsituation in der frühen Laktation nachgewiesen (HEUER ET AL. 2000), aber auch sie stellen Hilfsparameter dar. Dennoch wurde in dieser Studie auf Zuchtwerte und nicht etwa auf direktere Parameter des Proteoms oder Metaboloms, wie z. B. die VDBP- und Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentration oder die Energiebilanz (COFFEY ET AL. 2002) und Milchmetaboliten (KLEIN ET AL. 2010) zurückgegriffen.

Die statistische Power von GWAS hängt neben der Markerdichte und Studiengröße, nicht unerheblich von der Qualität der verwendeten Phänotyp-Daten ab (GODDARD & HAYES 2009; BARENDSE 2011). Der Vitamin-D-Gehalt beispielsweise ist häufig von Umwelteffekten beeinflusst (HOLICK 2007) was sich nachteilig auf die Heritabilität auswirken kann. Die

Datenerhebung für die Bestimmung der Energiebilanz in der Laktation und der VDBP- bzw. Vitamin-D-Konzentration im Blutserum von Milchkühen gestaltet sich als aufwändig und ist an großen Versuchsgruppen schwer durchführbar. Aber gerade bei quantitativen Merkmalen ist die Wahrscheinlichkeit, QTL mit geringen Merkmalseffekten zu identifizieren, stark von der Größe der Versuchspopulation abhängig (GODDARD & HAYES 2009). Hier bietet die Verfügbarkeit von Zuchtwerten, die im Rahmen der züchterischen Bearbeitung von Nutztierassen erfasst werden, für die Erforschung der genetischen Grundlagen komplexer Merkmale ausreichend Material (GODDARD & HAYES 2009). Ein weiterer Vorteil ist, dass es sich bei den implementierten Phänotypen um hoch-heritable Merkmale handelt, die im Rahmen der Nachkommenprüfung über eine große Anzahl an Tieren erhoben wurden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass mit indirekten Phänotypen plausible Kandidatengene identifiziert werden können. Des Weiteren konnten durch die Verwendung der Fettgehalt-Zuchtwerte jedes Laktationstages selbst QTL mit kleinen Merkmalseffekten aufgeklärt werden. Dies verdeutlicht welches zusätzliche Potential in den Daten steckt, die im Rahmen der Zuchtwertschätzung erfasst werden. Für diese Merkmale könnte sich, neben der klassischen Verwendung als Leistungsmerkmal, auch eine gesundheitliche Betrachtungsweise ergeben. Denn der Fettgehalt bzw. das FPR der frühen Laktation wird als Hilfsparameter für die Stoffwechselproblematik und Inzidenz von Erkrankungen diskutiert (HEUER ET AL. 2000; BUTTCHEREIT ET AL. 2012). Dies hätte für die Rentabilität der Milcherzeugung, unter dem Aspekt einer durch Produktionskrankheiten zu hohen Abgangsrate (RÖMER 2011), große ökonomische Bedeutung.

### 5.11 Auswirkungen der LD-Struktur auf die Identifizierung von Kandidatengenen

Die Ergebnisse der Polymorphismenanalyse der Gene *DGAT1* und *GHR* zeigen, dass abhängig von der LD-Struktur größere Abstände zwischen der kausalen Variante und dem Topmarker aus der GWAS auftreten können. Bei *GHR* konnte durch die Verwendung des hochdichten SNP-Chips die physikalische Distanz verkürzt werden. Die Entfernung beträgt dennoch 152 kb. Die als kausal postulierte Mutation F279Y (BLOTT ET AL. 2003) ist bei HF nur schwach im Kopplungsungleichgewicht mit dem Topmarker und wäre nach den Auswahlkriterien dieser Arbeit möglicherweise nicht eingehender untersucht worden. *DGAT1* bei FV zeigt, dass bei der Analyse mit einem dichteren SNP-Panel ein Marker in größerer physikalischer Entfernung zur kausalen Variante (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002) die Assoziation mit der höchsten Signifikanz aufweisen kann. Jedoch erstreckt sich aufgrund des starken Merkmalseffekts von *DGAT1* die signifikant assoziierte Region über einen Bereich von 5,9 Mb und beinhaltet damit die kausale Variante. Bei höherer

Markerdichte ist demnach nicht automatisch der signifikanteste SNP am dichtesten an der kausalen Variante lokalisiert. Die Position ist vielmehr von der LD-Struktur der entsprechenden Population abhängig. Die Identifizierung von Kandidatengen und kausalen QTN wird dadurch unter Umständen erschwert. Abhilfe kann hier die Implementierung von Next-Generation-Sequenzierdaten schaffen. Die an einer repräsentativen Tierausswahl detektierten Polymorphismen können auf die mit einem hochdichten SNP-Array genotypisierte Population imputiert und die kausale Mutation direkt in der Assoziationsstudie gefunden werden (FRIES & PAUSCH 2011). Der Vorteil der NGS liegt darin, dass alle Varianten erfasst werden und es nicht auf ein bestehendes LD mit Markern der Genotypisierung ankommt. Dennoch ist das Prinzip von GWAS, nämlich QTL aufgrund von Kopplungsungleichgewicht mit den genotypisierten Markern zu identifizieren, besonders in Nutztierpopulationen mit geringer effektiver Populationsgröße und ausgeprägten LD-Strukturen sinnvoll (GODDARD & HAYES 2009). Hierbei können jedoch auch Probleme auftreten, da seltene Varianten und Haplotypen nicht immer akkurat imputiert werden (PAUSCH ET AL. 2013).

## 5.12 BTA6 als Beispiel für die Assembly-Problematik beim Rind

Die Qualität des Assemblys ist wichtig für die Identifizierung kausaler Varianten. Mit der Neu-Assemblierung des Rindergenoms von BTA4.2 auf UMD3.1 konnte eine Verbesserung hinsichtlich der Vollständigkeit erzielt werden (ZIMIN ET AL. 2009). Aber auch das UMD3.1-Assembly weist Lücken und Fehler auf (PARTIPILO ET AL. 2011). Die Analyse der LD-Struktur der auf SNP-Microarrays befindlichen Polymorphismen deckte Inkonsistenzen im Assembly auf (BOHMANOVA ET AL. 2010). Marker mit unbekannter oder falscher Position stellen ein Problem bei GWAS dar, da sie zu falsch lokalisierten Assoziationen führen. Durch den Ausschluss dieser SNP im Prozess der Qualitätskontrolle tritt ein Informationsverlust auf, der in einer geringeren statistischen Power resultiert (KHATKAR ET AL. 2008). Das Chromosom BTA6 beispielsweise gibt Hinweise auf ein fehlerhaftes Assembly und Inkonsistenzen in der Annotation der Marker (BOHMANOVA ET AL. 2010). Die Betrachtung des UMD3.1-Assemblys hat ergeben, dass das *GC*-Gen von Bereichen unbekannter Sequenz umgeben ist. Möglicherweise entspricht die Annotation der Topmarker nicht der physikalischen Position auf BTA6.

## 5.13 Problematik der Verifizierung der Kausalität identifizierter Varianten

Komplexen Merkmalen liegen häufig Varianten in nicht-kodierenden Bereichen zugrunde (MACKAY 2001; GLAZIER ET AL. 2002). Die in dieser Studie identifizierten potentiell kau-

salen Varianten sind überwiegend in regulatorischen Regionen lokalisiert. Trotz intensiver Forschung gestaltet sich der Nachweis der Kausalität dieser Polymorphismen schwierig. *In-silico*-Vorhersagetools liefern häufig falsch positive Ergebnisse (FICKETT & WASSERMAN 2000), funktionale Analysen hingegen sind aufwändig und an großen Tierzahlen schwer durchführbar. Die kausalen Varianten sollten prinzipiell höher signifikante Assoziationen aufweisen als der Topmarker. Dennoch sind auch Szenarien möglich, wo dies nicht zutrifft. Die als kausal postulierte *DGAT1*-Variante K232A zeigt bei HF etwas geringer signifikant assoziierte Werte als der signifikanteste Marker ARS-BFGL-NGS-4939. Dies ist auf Imputationsungenauigkeiten zurückzuführen. Zudem können mehrere regulatorische Varianten als Haplotyp interagieren. Abhängig davon ob es sich um eine *cis*- oder *trans*-Position der SNP zueinander handelt, kann es zu unterschiedlichen Auswirkungen kommen (BIGGS ET AL. 2003). Bei quantitativen Merkmalen sind unter Umständen nicht nur mehrere Gene an der Ausprägung des Merkmals beteiligt, sondern auch innerhalb der Gene verschiedene regulatorische Varianten.

Die Feinkartierung von QTL über NGS-Daten ist vielversprechend (PAUSCH ET AL. 2012c), dennoch kann auch mit dieser Methode die kausale Variante nicht immer eindeutig identifiziert werden. Das LD zwischen genotypisierten Markern und der kausalen Mutation, das in GWAS für die Identifizierung von QTL zwingend erforderlich ist, kann zu einer Vielzahl assoziierter Polymorphismen führen, die lediglich aufgrund von Kopplungsungleichgewicht falsch positive Signale darstellen. Die im Promotorbereich des *PAEP*-Gens lokalisierten Polymorphismen weisen ein starkes Kopplungsungleichgewicht zueinander auf, so dass die eindeutige Identifizierung einer einzelnen kausalen Variante über den Signifikanzwert allein nicht möglich ist. Funktionale Analysen sind daher auch bei der Implementierung von NGS-Daten erforderlich. Die Expression von Genen ist ein vielschichtiger Prozess mit zahlreichen involvierten Komponenten, die es in Zukunft zu entschlüsseln gilt.

### 5.14 Validierung der Ergebnisse aus GWAS über den Vergleich zweier Rinder-Populationen

Um die durch multiples Testen (HOGGART ET AL. 2008) und Populationstratifikation auftretenden falsch positiven Assoziationen zu minimieren wurde eine Anpassung der Signifikanzgrenze nach Bonferroni vorgenommen und die Verwandtschaftsstruktur über einen Varianz-Komponenten-basierten Ansatz berücksichtigt. Da es sich zur Bestätigung der identifizierten QTL empfiehlt, die Studie in einer anderen Population zu wiederholen (PEARSON & MANOLIO 2008), wurde die Analyse für das Merkmal Fettgehalt sowohl in der HF- als auch in der FV-Population durchgeführt. Zur Aufklärung des kausalen

## 5.14 Validierung der Ergebnisse aus GWAS über den Vergleich zweier Rinder-Populationen

---

Zusammenhang von Gesundheitsmerkmalen mit dem für das VDBP kodierenden *GC*-Gen wurden ebenfalls beide Rassen betrachtet.

Die Analysen für den Fettgehalt, sowohl als Zuchtwert über die ganze Laktation als auch in der frühen Laktation, offenbarten QTL für die Rasse HF, die auch in FV identifiziert werden konnten. *DGAT1* und *GPAT4* sind bei beiden Rassen mit dem Fettgehalt der frühen Laktation assoziiert. Die K232A-Substitution in *DGAT1* gilt als kausale Variante (GRISART ET AL. 2004) und wurde bereits in verschiedenen Rassen für den Milchfettgehalt beschrieben (GRISART ET AL. 2002; WINTER ET AL. 2002). Bei beiden untersuchten Rassen zeigte *DGAT1* jedoch zu Beginn der Laktation schwächere Signifikanzen und einen geringeren Anteil an der erklärten Zuchtwert-Varianz als im späteren Laktationsverlauf.

Bei FV wurden QTL auf den Chromosomen BTA6, BTA11 und BTA19 identifiziert, die über die Rasse HF nicht bestätigt wurden. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass diese QTL bei HF nicht segregieren. Zudem sind die Zuchtwerte für den Fettgehalt bei beiden Rassen unterschiedlich definiert, was einen Vergleich erschwert. Da BTA11 und BTA19 bei Holstein-Friesian jedoch einen erkennbaren Anteil der additiv-genetischen Varianz erklären, ist es wahrscheinlich, dass es sich um tatsächliche QTL handelt, diese aber wegen zu geringen Merkmalseffekten und limitierter statistischer Power nicht als signifikant assoziiert identifiziert wurden. Dass diese QTL bei FV signifikante Werte aufweisen, ist eventuell auf die höhere Markerdichte und größere Individuenanzahl der GWAS zurückzuführen. Diese Parameter sind entscheidend für die erfolgreiche Identifizierung von QTL in GWAS (RISCH 2000; GODDARD & HAYES 2009). Angesichts der geringeren effektiven Populationsgröße von HF (KOENIG & SIMIANER 2006) erscheint jedoch die Markerdichte ausreichend um auch geringe Merkmalseffekte zu erfassen. Die nur bei FV identifizierten QTL beschreiben funktionell plausible Kandidatengene, so dass diese Gene oder QTL nicht per se als falsch positive Assoziationen angesehen werden sollten (IOANNIDIS ET AL. 2009). Bei HF konnte zwar keine Assoziation festgestellt werden, es erscheint jedoch aus funktionellen Gesichtspunkten plausibel, dass diese Gene, wie z. B. das *FASN*-Gen in die Ausprägung des Phänotyps involviert sind. Auch für die Evaluierung von Polymorphismen aus der Resequenzierung kann der Rasservergleich angewendet werden, wie KARIM ET AL. (2011) für QTN für das Merkmal Körpergröße beim Rind gezeigt haben. Dies funktioniert in Nutztierpopulationen dann, wenn es sich um eine Mutation handelt, die bereits vor Abspaltung der Rassen existiert hat oder wenn die Rassen nicht völlig unabhängig voneinander sind und es bereits Austausch von Genmaterial gegeben hat. Ein typisches Beispiel stellt die *DGAT1*-Variante dar (WINTER ET AL. 2002).

Da es sich bei den verwendeten Merkmalen um geschätzte Zuchtwerte handelt, die in den verschiedenen Rassen über unterschiedliche mathematische Modelle berechnet werden, ist die adäquate Vergleichbarkeit der Analysen nicht immer gegeben. Dies trifft z. B. auf die

Persistenz zu (COLE & VANRADEN 2006). Zusätzlich erschwert die Verwendung unterschiedlicher Markerdichten sowie die aufgrund effektiver Populationsgrößen unterschiedliche LD-Struktur den Vergleich. Bei FV konnte keine Korrektur auf *DGAT1* vorgenommen werden, da in dieser Rasse unterschiedliche Haplotypen mit der K232A-Variante existieren. Der auf das *GPIHBP1* hindeutende QTL der HF-Analyse konnte daher nicht bei FV evaluiert werden. Die Kausalität einer Variante, die in der Evaluierungspopulation nicht assoziiert ist, sollte grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, da durch epistatische Effekte eine antagonistische Wirkung mit einem anderen Loci auftreten kann.

### 5.15 GWAS im Zeitalter der genomischen Selektion

In der genomischen Selektion werden Zuchtwerte anhand von Genotypinformationen und nicht wie bislang üblich über die Leistung der Nachkommen geschätzt. Die dabei anfallenden Genotypdaten können in der Forschung zur Aufklärung ökonomisch bedeutender Leistungsmerkmale (HAYES ET AL. 2010) und auch anderer Phänotypen beim Rind (z. B. (PAUSCH ET AL. 2012a, b)) verwendet werden. In dieser Studie zeigte sich, dass die in der konventionellen Zuchtwertschätzung erfassten Phänotypdaten zusätzlichen Informationsgehalt aufweisen. Durch die Aufteilung der Zuchtwerte für den Fettgehalt der unterschiedlichen Laktationsphasen konnten QTL identifiziert werden, die über den klassischen Fettgehalt-Zuchtwert nicht erfasst worden wären.

Die in der Rinderzucht erhobenen, umfassenden Phänotypdaten werden im Rahmen der genomischen Selektion durch Genotypdaten komplettiert. Dadurch ergibt sich großes Potential für die Durchführung genomweiter Assoziationsstudien. Bislang konnten vor allem die funktionellen Gene und kausalen Polymorphismen monogen vererbter Merkmale in GWAS identifiziert werden (GODDARD 2008). Bei komplexen Zuchtmerkmalen gestaltet sich die Aufklärung der genetischen Architektur schwieriger, aber auch hier konnten wichtige QTL identifiziert werden (HAYES ET AL. 2010). Die assoziierten SNP können, ungeachtet ihrer Kausalität, als Marker eingesetzt werden um die genetische Konstitution von Individuen vorherzusagen (GODDARD 2008). Bei der Implementierung der genomischen Selektion wird dabei dem quantitativ-genetischen Modell entsprochen (FRIES & PAUSCH 2011). Die genomische Selektion stellt einen Meilenstein in der Tierzucht dar, da die Identifizierung züchterisch wichtiger Genorte ermöglicht wird und zugleich ein hoher Zuchtfortschritt, selbst bei komplexen Merkmalen, erreicht werden kann.

### 5.16 Genomweite Assoziationsstudien bei komplexen Merkmalen und die Implementierung von NGS

In genomweiten Assoziationsstudien konnten große Fortschritte in der Aufklärung komplexer Merkmale bei Mensch und Rind erzielt werden (z. B. HAYES ET AL. (2010); LANGO ALLEN ET AL. (2010); STAHL ET AL. (2010)). Grundlage hierfür sind moderne Genotypisierungsmethoden, die eine hohe Markerdichte bei einer großen Individuenanzahl ermöglichen. Bislang konnten beim Rind vor allem QTL mit moderaten bis großen Merkmalseffekten identifiziert werden (HAYES ET AL. 2010). Dennoch stellt sich die Situation derart dar, dass die durch die detektierten QTL erklärte Zuchtwert-Varianz aufsummiert nur einen Bruchteil der geschätzten Heritabilität des Merkmals ergibt. Die statistische Power der GWAS reicht aktuell nicht aus, um quantitative Merkmale vollständig aufzuklären. Auch in dieser Arbeit erklären die als signifikant assoziiert identifizierten QTL nur einen Teil der Zuchtwert-Varianz. Die Problematik genomweiter Genotypisierung liegt vor allem darin, dass zwischen der kausalen Variante und dem genotypisierten Marker ein Kopplungsungleichgewicht bestehen muss, damit der QTN als assoziiert erkannt wird (STRANGER ET AL. 2011). Durch die Entwicklung neuer Sequenzieretechnologien ist es möglich, die vollständige genetische Variation von Individuen zu erfassen.

In dieser Studie wurde in Kandidatengenomen aus der GWAS systematisch nach Polymorphismen mittels NGS gesucht und diese auf funktionelle Zusammenhänge untersucht. Es war jedoch nicht möglich alle identifizierten Varianten auf Assoziationen mit dem jeweiligen Merkmal in den Populationen zu analysieren. Durch die Resequenzierung einflussreicher Gründertiere und anschließende Imputation der Genotypen auf die gesamte Population können Genotyp-Datensätze für GWAS erzeugt werden. Die kausalen QTN wären so direkt in der Assoziationsstudie implementiert und die Notwendigkeit eines bestehenden Kopplungsungleichgewichts entfällt (FRIES & PAUSCH 2011). Zudem können die identifizierten QTN in der genomischen Selektion züchterische Anwendung finden.



## 6 Zusammenfassung

Der Umgang von Milchkühen mit der Stoffwechselbelastung in der frühen Laktation kann als Merkmalskomplex mit ökonomischer und gesundheitlicher Relevanz angesehen werden. Durch die Implementierung genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) konnten in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte in der Aufklärung der genetischen Architektur quantitativer Merkmale erzielt werden. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für die zielgerichtete züchterische Bearbeitung von Stoffwechsel- und Gesundheitsmerkmalen dar.

In dieser Arbeit sollten die genetischen Grundlagen komplex vererbter Merkmale in GWAS aufgeklärt werden. Ziel war es, Kandidatengene in Hinblick auf die Stoffwechselsituation in der frühen Laktation über die Parameter Fettgehalt und Fett-Protein-Verhältnis der Milch zu identifizieren sowie die Zusammenhänge zwischen Gesundheits- und Leistungsmerkmalen und Varianten im Vitamin-D-bindende-Protein kodierenden *GC*-Gen zu untersuchen.

Die Basis der Analysen bildeten Zuchtwerte von Besamungsbullen der Rassen Fleckvieh (FV) und Holstein-Friesian (HF). Von den 2327 HF- und 3643 FV-Bullen standen Genotypinformationen aus der mitteldichten und hochdichten Genotypisierung von 44.280 bzw. 658.385 SNP zur Verfügung. Mit einem Varianz-Komponenten-basiertem Ansatz wurden in GWAS unter Berücksichtigung von Populationsstratifikation Kandidatengene für Gesundheits- und Leistungsmerkmale identifiziert. Die Gene wurden systematisch mittels Sanger-Sequenzierung und Next-Generation-Sequenzierung auf Polymorphismen untersucht und diese *in-silico* auf funktionelle Zusammenhänge überprüft.

In den GWAS mit den Merkmalen Fettgehalt-Zuchtwert und Fettgehalt der verschiedenen Laktationsphasen konnten bei den Rassen FV und HF insgesamt neun Quantitative-Trait-Loci (QTL) detektiert werden. Als positionelle und funktionelle Kandidatengene wurden *EPS8*, *MGST1*, *CSN2*, *PAEP*, *DGAT1*, *GPIHBP1*, *FASN*, *GHR* und *GPAT4* identifiziert. Das Auftreten signifikanter Assoziationen an den unterschiedlichen QTL variierte über den Laktationsverlauf. Während auf BTA5, 6 und 20 ausschließlich in der späten Laktation Assoziationssignale identifiziert wurden, zeigte *GPAT4* auf BTA27 bei beiden Rassen signifikante Assoziationen mit dem Fettgehalt der frühen Laktation. Für die Promotorvariante TUM-3974 (ss410759404) des *GPAT4*-Gens konnten Bindestellen für die in den Fettstoffwechsel involvierten Faktoren PPAR $\alpha$ :RXR $\alpha$  und CREB vorhergesagt werden.

Auf BTA6 konnte ein QTL im Bereich des *GC*-Gens festgestellt werden der mit Gesundheits- und Leistungsmerkmalen bei HF und FV assoziiert ist. Der im Promotor lokalisierte SNP TUM-4005 (ss683327748) wurde bei beiden Rassen über das LD mit den jeweiligen Topmarkern als Kandidaten-Polymorphismus identifiziert. Für die Variante wurde eine mögliche Bindestelle für C/EBP vorhergesagt. Dieser Transkriptionsfaktor steht in Zusammenhang mit der Regulation von metabolischen Prozessen in der Leber. In der GWAS bei FV für die Merkmale Persistenz und Fitness zeigte der SNP TUM-4005 die höchste Signifikanz ( $P=4,00 \times 10^{-14}$  bzw.  $P=1,12 \times 10^{-12}$ ). Das häufigere T-Allel war bei FV negativ mit Gesundheitsmerkmalen und positiv mit der Milchmenge assoziiert.

Die in dieser Studie identifizierten QTL tragen zu einem besseren Verständnis der Stoffwechselfvorgänge in der frühen Laktation und allgemeiner gesundheitlicher Aspekte bei. Die assoziierten Polymorphismen können als spezifische Marker in der genomischen Zuchtwertschätzung implementiert werden. Mithilfe der genomischen Selektion können somit Fortschritte in Hinblick auf eine ökonomische Verbesserung der Milchproduktion und die Verlängerung der aus tierethischer Sicht zu kurzen Lebensdauer von Milchkühen, erzielt werden.

## 7 Summary

The way in which dairy cows respond to early lactational metabolic stress can be considered as a trait complex that is relevant to economics and health. The implementation of genome-wide association studies (GWAS) resulted in substantial progress towards the understanding of the genetic architecture of quantitative traits. This is an important prerequisite for goal-oriented breeding of metabolic and health traits.

The aim of this study was to investigate the genetic background of complex traits with GWAS. The specific goals were to identify candidate genes for metabolic state in early lactation by using the parameters fat content and fat-protein-ratio in milk as well as to investigate the relationship between health and performance traits and polymorphisms in the vitamin-D-binding protein encoding *GC* gene.

The study was based on the analysis of estimated breeding values of insemination bulls of German Fleckvieh (FV) and Holstein-Friesian (HF) breeds. Genotype data from medium and high density genotyping of 2327 HF bulls and 44,280 SNPs as well as of 3643 FV bulls and 658,385 SNPs was available. Candidate genes for health and performance traits were identified using a variance component based approach to correct for population stratification. The genes were screened for polymorphisms using Sanger sequencing and next generation sequencing. The detected variants were analyzed in silico for functionality.

In total, nine quantitative trait loci (QTL) were identified for the breeds FV and HF by GWAS for fat content breeding value and fat content of various lactation stages. The postulated underlying candidate genes were *EPS8*, *MGST1*, *CSN2*, *PAEP*, *DGAT1*, *GPIHBP1*, *FASN*, *GHR* and *GPAT4*. Significant associations varied with lactation stage. While BTA5, 6 and 20 exclusively showed association signals during late lactation, *GPAT4* on BTA27 was significantly associated with fat content in early lactation for both breeds. For the promoter variant TUM-3974 (ss410759404) of *GPAT4* a putative transcription factor binding site was predicted for PPAR $\alpha$ :RXR $\alpha$  and CREB which are involved in fat metabolism.

On BTA6 a QTL encompassing the *GC* gene was identified for health and performance traits in HF and FV. The promoter SNP TUM-4005 (ss683327748) was considered as candidate polymorphism showing high linkage disequilibrium with the top markers in both breeds. A putative binding site for the transcription factor C/EBP was predicted.

## 7 Summary

---

This transcription factor is related to the regulation of metabolic processes in the liver. In the GWAS for the estimated breeding values persistence and fitness in FV the SNP TUM-4005 showed the most significant association ( $P=4,00 \times 10^{-14}$  and  $P=1,12 \times 10^{-12}$ , respectively). In FV, the major T allele is negatively correlated with health traits and positively correlated with milk yield.

The QTL identified in this study allow a better understanding of the metabolic processes in early lactation and of general health aspects. The associated polymorphisms can be implemented as specific marker in the estimation of genomic breeding values. The use of genomic selection can contribute to an economic improvement of milk production and an elongation of the productive life of dairy cows, which from an animal ethics point of view is too short.

## 8 Literaturverzeichnis

ABE, T., SABURI, J., HASEBE, H., NAKAGAWA, T., MISUMI, S., NADE, T., NAKAJIMA, H., SHOJI, N., KOBAYASHI, M., & KOBAYASHI, E. (2009) Novel mutations of the FASN gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef. *Biochem Genet* **47**(5-6):397–411.

ADR (2012) *Rinderproduktion in Deutschland 2011*. Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e.V.

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**(4):248–249.

AHN, J., YU, K., STOLZENBERG-SOLOMON, R., SIMON, K. C., MCCULLOUGH, M. L., GALLICCHIO, L., JACOBS, E. J., ASCHERIO, A., HELZLSOUER, K., JACOBS, K. B., LI, Q., WEINSTEIN, S. J., PURDUE, M., VIRTAMO, J., HORST, R., WHEELER, W., CHANOCK, S., HUNTER, D. J., HAYES, R. B., KRAFT, P., & ALBANES, D. (2010) Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* **19**(13):2739–2745.

BARENDSE, W. (2011) The effect of measurement error of phenotypes on genome wide association studies. *BMC Genomics* **12**:232–232.

BARRETT, J. C., FRY, B., MALLER, J., & DALY, M. J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**(2):263–265.

BAUMAN, D. E. & DAVIS, C. (1974) *Biosynthesis of milk fat*. 31-75. Academic Press, New York.

BEIGNEUX, A. P., DAVIES, B. S., GIN, P., WEINSTEIN, M. M., FARBER, E., QIAO, X., PEALE, F., BUNTING, S., WALZEM, R. L., WONG, J. S., BLANER, W. S., DING, Z.-M., MELFORD, K., WONGSIRIROJ, N., SHU, X., DE SAUVAGE, F., RYAN, R. O., FONG, L. G., BENSADOUN, A., & YOUNG, S. G. (2007) Glycosylphosphatidylinositol-Anchored High-Density Lipoprotein-Binding Protein 1 Plays a Critical Role in the Lipolytic Processing of Chylomicrons. *Cell Metabolism* **5**(4):279 – 291.

BEIGNEUX, A. P., FRANSSSEN, R., BENSADOUN, A., GIN, P., MELFORD, K., PETER, J., WALZEM, R. L., WEINSTEIN, M. M., DAVIES, B. S., KUIVENHOVEN, J. A., KASTELEIN, J. J., FONG, L. G., DALLINGA-THIE, G. M., & YOUNG, S. G. (2009) Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(6):956–962.

- BEIGNEUX, A. P., VERGNES, L., QIAO, X., QUATELA, S., DAVIS, R., WATKINS, S. M., COLEMAN, R. A., WALZEM, R. L., PHILIPS, M., REUE, K., & YOUNG, S. G. (2006) Agpat6—a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium. *J Lipid Res* **47**(4):734–744.
- BELL, A. W. (1995) Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci* **73**(9):2804–2819.
- BERRY, S. D., LOPEZ-VILLALOBOS, N., BEATTIE, E. M., DAVIS, S. R., ADAMS, L. F., THOMAS, N. L., ANKERSMIT-UDY, A. E., STANFIELD, A. M., LEHNERT, K., WARD, H. E., ARIAS, J. A., SPELMAN, R. J., & SNELL, R. G. (2010) Mapping a quantitative trait locus for the concentration of beta-lactoglobulin in milk, and the effect of beta-lactoglobulin genetic variants on the composition of milk from Holstein-Friesian x Jersey crossbred cows. *N Z Vet J* **58**(1):1–5.
- BIGGS, P. J., VOGEL, H., SAGE, M., MARTIN, L. A., DONEHOWER, L. A., & BRADLEY, A. (2003) Allelic phasing of a mouse chromosome 11 deficiency influences p53 tumorigenicity. *Oncogene* **22**(21):3288–3296.
- BIONAZ, M. & LOOR, J. J. (2008a) ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *J Nutr* **138**(6):1019–1024.
- BIONAZ, M. & LOOR, J. J. (2008b) Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* **9**:366–366.
- BLOTT, S., KIM, J. J., MOISIO, S., SCHMIDT-KÜNTZEL, A., CORNET, A., BERZI, P., CAMBISANO, N., FORD, C., GRISART, B., JOHNSON, D., KARIM, L., SIMON, P., SNELL, R., SPELMAN, R., WONG, J., VILKKI, J., GEORGES, M., FARNIR, F., & COPPIETERS, W. (2003) Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics* **163**(1):253–266.
- BOHMANOVA, J., SARGOLZAEI, M., & SCHENKEL, F. S. (2010) Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins. *BMC Genomics* **11**:421–421.
- BOUWMAN, A. C., BOVENHUIS, H., VISKER, M. H., & VAN ARENDONK, J. A. (2011) Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. *BMC Genet* **12**:43–43.
- BOVENHUIS, H., VAN ARENDONK, J. A., & KORVER, S. (1992) Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J Dairy Sci* **75**(9):2549–2559.
- BOVENHUIS, H. & WELLER, J. I. (1994) Mapping and analysis of dairy cattle quantitative trait loci by maximum likelihood methodology using milk protein genes as genetic markers. *Genetics* **137**(1):267–280.
- BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM, ELSIK, C. G., TELLAM, R. L., & WORLEY (2009) The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* **324**(5926):522–528.

- BOVINE HAPMAP CONSORTIUM, GIBBS, R. A., TAYLOR, J. F., VAN TASSELL, C. P., BARENDSE, W., EVERSOLE, K. A., GILL, C. A., GREEN, R. D., HAMERNIK, D. L., KAPPES, S. M., LIEN, S., MATUKUMALLI, L. K., MCEWAN, J. C., NAZARETH, L. V., SCHNABEL, R. D., WEINSTOCK, G. M., WHEELER, D. A., AJMONE-MARSAN, P., BOETTCHER, P. J., CAETANO, A. R., GARCIA, J. F., HANOTTE, O., MARIANI, P., SKOW, L. C., SONSTEGARD, T. S., WILLIAMS, J. L., DIALLO, B., HAILEMARIAM, L., MARTINEZ, M. L., MORRIS, C. A., SILVA, L. O., SPELMAN, R. J., MULATU, W., ZHAO, K., ABBEY, C. A., AGABA, M., ARAUJO, F. R., BUNCH, R. J., BURTON, J., GORNI, C., OLIVIER, H., HARRISON, B. E., LUFF, B., MACHADO, M. A., MWAKAYA, J., PLASTOW, G., SIM, W., SMITH, T., THOMAS, M. B., VALENTINI, A., WILLIAMS, P., WOMACK, J., WOOLLIAMS, J. A., LIU, Y., QIN, X., WORLEY, K. C., GAO, C., JIANG, H., MOORE, S. S., REN, Y., SONG, X. Z., BUSTAMANTE, C. D., HERNANDEZ, R. D., MUZNY, D. M., PATIL, S., SAN LUCAS, A., FU, Q., KENT, M. P., VEGA, R., MATUKUMALLI, A., MCWILLIAM, S., SCLEP, G., BRYC, K., CHOI, J., GAO, H., GREFENSTETTE, J. J., MURDOCH, B., STELLA, A., VILLA-ANGULO, R., WRIGHT, M., AERTS, J., JANN, O., NEGRINI, R., GODDARD, M. E., HAYES, B. J., BRADLEY, D. G., BARBOSA DA SILVA, M., LAU, L. P., LIU, G. E., LYNN, D. J., PANZITTA, F., & DODDS, K. G. (2009) Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science* **324**(5926):528–532.
- BRAUN, A., KOFLER, A., MORAWIETZ, S., & CLEVE, H. (1993) Sequence and organization of the human vitamin D-binding protein gene. *Biochim Biophys Acta* **1216**(3):385–394.
- BREATHNACH, R., BENOIST, C., O'HARE, K., GANNON, F., & CHAMBON, P. (1978) Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10):4853–4857.
- 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**(2):210–223.
- BU, F. X., ARMAS, L., LAPPE, J., ZHOU, Y., GAO, G., WANG, H. W., RECKER, R., & ZHAO, L. J. (2010) Comprehensive association analysis of nine candidate genes with serum 25-hydroxy vitamin D levels among healthy Caucasian subjects. *Hum Genet* **128**(5):549–556.
- BUTLER, W. & SMITH, R. (1989) Interrelationships Between Energy Balance and Postpartum Reproductive Function in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* **72**(3):767 – 783.
- BUTTCHEREIT, N., STAMER, E., JUNGE, W., & THALLER, G. (2010) Evaluation of five lactation curve models fitted for fat:protein ratio of milk and daily energy balance. *J Dairy Sci* **93**(4):1702–1712.
- BUTTCHEREIT, N., STAMER, E., JUNGE, W., & THALLER, G. (2011) Short communication: genetic relationships among daily energy balance, feed intake, body condition score, and fat to protein ratio of milk in dairy cows. *J Dairy Sci* **94**(3):1586–1591.

- BUTTCHEREIT, N., STAMER, E., JUNGE, W., & THALLER, G. (2012) Genetic parameters for energy balance, fat /protein ratio, body condition score and disease traits in German Holstein cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **129**(4):280–288.
- CARNAGEY, K. M., HUFF-LONERGAN, E. J., LONERGAN, S. M., TRENKLE, A., HORST, R. L., & BEITZ, D. C. (2008) Use of 25-hydroxyvitamin D3 and dietary calcium to improve tenderness of beef from the round of beef cows. *J Anim Sci* **86**(7):1637–1648.
- CASES, S., SMITH, S. J., ZHENG, Y. W., MYERS, H. M., LEAR, S. R., SANDE, E., NOVAK, S., COLLINS, C., WELCH, C. B., LUSIS, A. J., ERICKSON, S. K., & FARESE, R. V. (1998) Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22):13.018–13.023.
- CHAKRAVARTY, K., CASSUTO, H., RESHEF, L., & HANSON, R. W. (2005) Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**(3):129–154.
- CHAMBERLAIN, A. J., MCPARTLAN, H. C., & GODDARD, M. E. (2007) The number of loci that affect milk production traits in dairy cattle. *Genetics* **177**(2):1117–1123.
- CHARRIÈRE, S., PERETTI, N., BERNARD, S., DI FILIPPO, M., SASSOLAS, A., MERLIN, M., DELAY, M., DEBARD, C., LEFAT, E., LACHAUX, A., MOULIN, P., & MARÇAIS, C. (2011) GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab* **96**(10):1675–1679.
- CHATTERJEE, S., SZUSTAKOWSKI, J. D., NANGUNERI, N. R., MICKANIN, C., LABOW, M. A., NOHTURFFT, A., DEV, K. K., & SIVASANKARAN, R. (2009) Identification of novel genes and pathways regulating SREBP transcriptional activity. *PLoS One* **4**(4):e5197.
- CHEN, Y. Q., KUO, M. S., LI, S., BUI, H. H., PEAKE, D. A., SANDERS, P. E., THIBODEAUX, S. J., CHU, S., QIAN, Y. W., ZHAO, Y., BRETT, D. S., MOLLER, D. E., KONRAD, R. J., BEIGNEUX, A. P., YOUNG, S. G., & CAO, G. (2008) AGPAT6 is a novel microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J Biol Chem* **283**(15):10.048–10.057.
- CIANFEROTTI, L. & MARCOCCI, C. (2012) Subclinical vitamin D deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **26**(4):523–537.
- COBALEDA, C., SCHEBESTA, A., DELOGU, A., & BUSSLINGER, M. (2007) Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* **8**(5):463–470.
- COFFEY, M. P., SIMM, G., & BROTHERSTONE, S. (2002) Energy balance profiles for the first three lactations of dairy cows estimated using random regression. *J Dairy Sci* **85**(10):2669–2678.
- COHEN-ZINDER, M., DONTU, R., LARKIN, D. M., KUMAR, C. G., RODRIGUEZ-ZAS, S. L., ANDROPOLIS, K. E., OLIVEIRA, R., & LEWIN, H. A. (2011) Multisite haplotype on cattle chromosome 3 is associated with quantitative trait locus effects on lactation traits. *Physiol Genomics* **43**(21):1185–1197.

- COHEN-ZINDER, M., SEROUSSI, E., LARKIN, D. M., LOOR, J. J., EVERTS-VAN DER WIND, A., LEE, J. H., DRACKLEY, J. K., BAND, M. R., HERNANDEZ, A. G., SHANI, M., LEWIN, H. A., WELLER, J. I., & RON, M. (2005) Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res* **15**(7):936–944.
- COLE, J. B. & VANRADEN, P. M. (2006) Genetic evaluation and best prediction of lactation persistency. *J Dairy Sci* **89**(7):2722–2728.
- COLLARD, B. L., BOETTCHER, P. J., DEKKERS, J. C., PETITCLERC, D., & SCHAEFFER, L. R. (2000) Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. *J Dairy Sci* **83**(11):2683–2690.
- COOKE, N. E., MCLEOD, J. F., WANG, X. K., & RAY, K. (1991) Vitamin D binding protein: genomic structure, functional domains, and mRNA expression in tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**(4-6):787–793.
- DAETWYLER, H. D., SCHENKEL, F. S., SARGOLZAEI, M., & ROBINSON, J. A. (2008) A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. *J Dairy Sci* **91**(8):3225–3236.
- DAVIES, B. S., BEIGNEUX, A. P., II, R. H. B., TU, Y., GIN, P., WEINSTEIN, M. M., NOBUMORI, C., NYRÉN, R., GOLDBERG, I., OLIVECRONA, G., BENSADOUN, A., YOUNG, S. G., & FONG, L. G. (2010) GPIHBP1 Is Responsible for the Entry of Lipoprotein Lipase into Capillaries. *Cell Metabolism* **12**(1):42–52.
- DAVIES, B. S., WAKI, H., BEIGNEUX, A. P., FARBER, E., WEINSTEIN, M. M., WILPITZ, D. C., TAI, L. J., EVANS, R. M., FONG, L. G., TONTONNOZ, P., & YOUNG, S. G. (2008) The expression of GPIHBP1, an endothelial cell binding site for lipoprotein lipase and chylomicrons, is induced by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Mol Endocrinol* **22**(11):2496–2504.
- DE VRIES, M. J. & VEERKAMP, R. F. (2000) Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *J Dairy Sci* **83**(1):62–69.
- DEKKERS, J., HAG, J. T., & WEERSINK, A. (1998) Economic aspects of persistency of lactation in dairy cattle. *Livestock Production Science* **53**(3):237–252.
- DESCOMBES, P., CHOJKIER, M., LICHTSTEINER, S., FALVEY, E., & SCHIBLER, U. (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev* **4**(9):1541–1551.
- DESMET, F. O., HAMROUN, D., LALANDE, M., COLLOD-BÉROUD, G., CLAUSTRES, M., & BÉROUD, C. (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* **37**(9):e67.
- DOBSON, R. C. & WARD, G. (1974) Vitamin D physiology and its importance in dairy cattle: a review. *J Dairy Sci* **57**(9):985–991.

- DUNSHEA, F. R., BELL, A. W., & TRIGG, T. E. (1989) Relations between plasma non-esterified fatty acid metabolism and body fat mobilization in primiparous lactating goats. *Br J Nutr* **62**(1):51–61.
- EGGER-DANNER, C., WILLAM, A., FUERST, C., SCHWARZENBACHER, H., & FUERST-WALTL, B. (2012) Hot topic: Effect of breeding strategies using genomic information on fitness and health. *J Dairy Sci* **95**(8):4600–4609.
- ESSL, A. (1998) Longevity in dairy cattle breeding: a review. *Livestock Production Science* **57**:79–89.
- ETHERTON, T. D. & BAUMAN, D. E. (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* **78**(3):745–761.
- EWING, B. & GREEN, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**(3):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**(3):175–185.
- FALAKI, M., PRANDI, A., CORRADINI, C., SNEYERS, M., GENGLER, N., MASSART, S., FAZZINI, U., BURNY, A., PORTETELLE, D., & RENAUVILLE, R. (1997) Relationships of growth hormone gene and milk protein polymorphisms to milk production traits in Simmental cattle. *J Dairy Res* **64**(1):47–56.
- FAZIOLI, F., MINICHELLO, L., MATOSKA, V., CASTAGNINO, P., MIKI, T., WONG, W. T., & DI FIORE, P. P. (1993) Eps8, a substrate for the epidermal growth factor receptor kinase, enhances EGF-dependent mitogenic signals. *EMBO J* **12**(10):3799–3808.
- FICKETT, J. W. & WASSERMAN, W. W. (2000) Discovery and modeling of transcriptional regulatory regions. *Curr Opin Biotechnol* **11**(1):19–24.
- FOLCH, J. M., DOVČ, P., & MEDRANO, J. F. (1999) Differential expression of bovine beta-lactoglobulin A and B promoter variants in transiently transfected HC11 cells. *Journal of Dairy Research* **66**:537–544.
- FRANSSEN, R., YOUNG, S. G., PEELMAN, F., HERTECANT, J., SIERTS, J. A., SCHIMMEL, A. W., BENSADOUN, A., KASTELEIN, J. J., FONG, L. G., & DALLINGA-THIE, G. M. (2010) Chylomicronemia With Low Postheparin Lipoprotein Lipase Levels in the Setting of GPIIIBP1 Defects. *Circulation: Cardiovascular Genetics* **3**:169–178.
- FREYER, G., SORENSEN, P., KÜHN, C., WEIKARD, R., & HOESCHELE, I. (2003) Search for pleiotropic QTL on chromosome BTA6 affecting yield traits of milk production. *J Dairy Sci* **86**(3):999–1008.
- FRIES, R. & PAUSCH, H. (2011) Individuelle Genomsequenzierung von Nutztieren - auf dem Weg zur genomischen Selektion 2.0. *Züchtungskunde* **83**(4):371–381.
- FÜRST, C. & FÜRST-WALTL, B. (2006) Züchterische Aspekte zu Kalbeverlauf, Totgeburtensrate und Nutzungsdauer in der Milchviehzucht. *Züchtungskunde* **78**(5):365–383.

- GAWANTKA, V., DELIUS, H., HIRSCHFELD, K., BLUMENSTOCK, C., & NIEHRS, C. (1995) Antagonizing the Spemann organizer: role of the homeobox gene *Xvent-1*. *EMBO J* **14**(24):6268–6279.
- GE, W., DAVIS, M. E., HINES, H. C., IRVIN, K. M., & SIMMEN, R. C. M. (2003) Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle<sup>1,2,3</sup>. *Journal of Animal Science* **81**:641–648.
- GEORGES, M., NIELSEN, D., MACKINNON, M., MISHRA, A., OKIMOTO, R., PASQUINO, A. T., SARGEANT, L. S., SORENSEN, A., STEELE, M. R., & ZHAO, X. (1995) Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* **139**(2):907–920.
- GILLUND, P., REKSEN, O., GRÖHN, Y. T., & KARLBERG, K. (2001) Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *J Dairy Sci* **84**(6):1390–1396.
- GILSANZ, V., KREMER, A., MO, A. O., WREN, T. A., & KREMER, R. (2010) Vitamin D status and its relation to muscle mass and muscle fat in young women. *J Clin Endocrinol Metab* **95**(4):1595–1601.
- GLAZIER, A. M., NADEAU, J. H., & AITMAN, T. J. (2002) Finding genes that underlie complex traits. *Science* **298**(5602):2345–2349.
- GODDARD, M. E. (2008) The use of high density genotyping in animal health. *Dev Biol (Basel)* **132**:383–389.
- GODDARD, M. E. & HAYES, B. J. (2009) Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat Rev Genet* **10**(6):381–391.
- GOMME, P. T. & BERTOLINI, J. (2004) Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. *Trends Biotechnol* **22**(7):340–345.
- GORDON, D., ABAJIAN, C., & GREEN, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**(3):195–202.
- GOZDZIK, A., ZHU, J., WONG, B. Y., FU, L., COLE, D. E., & PARRA, E. J. (2011) Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry. *J Steroid Biochem Mol Biol* **127**(3-5):405–412.
- GOZHO, G. N., KRAUSE, D. O., & PLAIZIER, J. C. (2007) Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J Dairy Sci* **90**(2):856–866.
- GREMME, G., BRENDEL, V., SPARKS, M. E., & KURTZ, S. (2005) Engineering a software tool for gene structure prediction in higher organisms. *Information and Software Technology* **47**(15):965–978.

- GRISART, B., COPPIETERS, W., FARNIR, F., KARIM, L., FORD, C., BERZI, P., CAMBISANO, N., MNI, M., REID, S., SIMON, P., SPELMAN, R., GEORGES, M., & SNELL, R. (2002) Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res* **12**(2):222–231.
- GRISART, B., FARNIR, F., KARIM, L., CAMBISANO, N., KIM, J. J., KVASZ, A., MNI, M., SIMON, P., FRÈRE, J. M., COPPIETERS, W., & GEORGES, M. (2004) Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8):2398–2403.
- GROSS, J., VAN DORLAND, H. A., BRUCKMAIER, R. M., & SCHWARZ, F. J. (2011) Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *J Dairy Res* **78**(4):479–488.
- HADDAD, J. G., HU, Y. Z., KOWALSKI, M. A., LARAMORE, C., RAY, K., ROBZYK, P., & COOKE, N. E. (1992) Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Biochemistry* **31**(31):7174–7181.
- 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**(9):e1001.139.
- HAYES, H. C. & PETIT, E. J. (1993) Mapping of the beta-lactoglobulin gene and of an immunoglobulin M heavy chain-like sequence to homoeologous cattle, sheep, and goat chromosomes. *Mamm Genome* **4**(4):207–210.
- HECK, J. M., SCHENNINK, A., VAN VALENBERG, H. J., BOVENHUIS, H., VISKER, M. H., VAN ARENDONK, J. A., & VAN HOOIJDONK, A. C. (2009) Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J Dairy Sci* **92**(3):1192–1202.
- HERNELL, O. & OLIVECRONA, T. (1974) Human milk lipases. I. Serum-stimulated lipase. *J Lipid Res* **15**(4):367–374.
- HEUER, C., STRAALLEN, W. V., SCHUKKEN, Y., DIRKZWAGER, A., & NOORDHUIZEN, J. (2000) Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Livestock Production Science* **65**(1-2):91–105.
- HIBBS, J. W. & CONRAD, H. R. (1976) Milk fever in dairy cows. VII. Effect of continuous vitamin D feeding on incidence of milk fever. *J Dairy Sci* **59**(11):1944–1946.
- HILLGARTNER, F. B., SALATI, L. M., & GOODRIDGE, A. G. (1995) Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol Rev* **75**(1):47–76.
- HINDORFF, L. A., SETHUPATHY, P., JUNKINS, H. A., RAMOS, E. M., MEHTA, J. P., COLLINS, F. S., & MANOLIO, T. A. (2009) Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(23):9362–9367.

- HOGGART, C. J., CLARK, T. G., DE IORIO, M., WHITTAKER, J. C., & BALDING, D. J. (2008) Genome-wide significance for dense SNP and resequencing data. *Genet Epidemiol* **32**(2):179–185.
- HOLICK, M. F. (2007) Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine* **357**:266–281.
- HOLICK, M. F. (2011) Vitamin D: a d-lightful solution for health. *J Investig Med* **59**(6):872–880.
- HOLICK, M. F. & CHEN, T. C. (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* **87**(4):1080S–1086S.
- HOOGHE, B., HULPIAU, P., VAN ROY, F., & DE BLESER, P. (2008) ConTra: a promoter alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species. *Nucleic Acids Res* **36**(Web Server issue):128–132.
- HORST, R., GOFF, J., & REINHARDT, T. (1994) Calcium and Vitamin D Metabolism in the Dairy Cow. *Journal of Dairy Science* **77**(7):1936–1951.
- HOWIE, B., FUCHSBERGER, C., STEPHENS, M., MARCHINI, J., & ABECASIS, G. R. (2012) Fast and accurate genotype imputation in genome-wide association studies through pre-phasing. *Nat Genet* **44**(8):955–959.
- HSU, M. H., CHIRALA, S. S., & WAKIL, S. J. (1996) Human fatty-acid synthase gene. Evidence for the presence of two promoters and their functional interaction. *J Biol Chem* **271**(23):13.584–13.592.
- IKONEN, T., BOVENHUIS, H., OJALA, M., RUOTTINEN, O., & GEORGES, M. (2001) Associations between casein haplotypes and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. *J Dairy Sci* **84**(2):507–514.
- IOANNIDIS, J. P., THOMAS, G., & DALY, M. J. (2009) Validating, augmenting and refining genome-wide association signals. *Nat Rev Genet* **10**(5):318–329.
- JANSEN, S., AIGNER, B., PAUSCH, H., WYSOCKI, M., ECK, S., WIELAND, T., BENET-PAGÈS, A., STROM, T., MEITINGER, T., & FRIES, R. (2011) Sichtung der genomischen Variation der Fleckvieh Population durch Resequenzierung bei niedriger bis mittlerer Abdeckung. *Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde eV und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften eV Freising-Weihenstephan*.
- JENSEN, R. G. (2002) The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci* **85**(2):295–350.
- JIANG, L., LIU, J., SUN, D., MA, P., DING, X., YU, Y., & ZHANG, Q. (2010) Genome wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein population. *PLoS One* **5**(10):e13.661.

- KANG, H. M., SUL, J. H., SERVICE, S. K., ZAITLEN, N. A., KONG, S. Y., FREIMER, N. B., SABATTI, C., & ESKIN, E. (2010) Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nat Genet* **42**(4):348–354.
- KARIM, L., TAKEDA, H., LIN, L., DRUET, T., ARIAS, J. A., BAURAIN, D., CAMBISANO, N., DAVIS, S. R., FARNIR, F., GRISART, B., HARRIS, B. L., KEEHAN, M. D., LITTLEJOHN, M. D., SPELMAN, R. J., GEORGES, M., & COPPIETERS, W. (2011) Variants modulating the expression of a chromosome domain encompassing PLAG1 influence bovine stature. *Nat Genet* **43**(5):405–413.
- KHATKAR, M. S., NICHOLAS, F. W., COLLINS, A. R., ZENGER, K. R., CAVANAGH, J. A., 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**:187–187.
- KHATKAR, M. S., THOMSON, P. C., TAMMEN, I., & RAADSMA, H. W. (2004) Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genet Sel Evol* **36**(2):163–190.
- KHOVIDHUNKIT, W. (2004) Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *Journal of Lipid Research* **45**:1169–1196.
- KIDD, L. C., PALTOO, D. N., WANG, S., CHEN, W., AKEREYENI, F., ISAACS, W., AHAGHOTU, C., & KITTLES, R. (2005) Sequence variation within the 5' regulatory regions of the vitamin D binding protein and receptor genes and prostate cancer risk. *Prostate* **64**(3):272–282.
- KIM, H. B., KIM, W. H., HAN, K. L., PARK, J. H., LEE, J., YEO, J., & JUNG, M. H. (2010) cAMP-response element binding protein (CREB) positively regulates mouse adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **391**(1):634–639.
- KLEIN, M. S., ALMSTETTER, M. F., SCHLAMBERGER, G., NÜRNBERGER, N., DETTMER, K., OEFNER, P. J., MEYER, H. H., WIEDEMANN, S., & GRONWALD, W. (2010) Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. *J Dairy Sci* **93**(4):1539–1550.
- KLEIN, R. J. (2005) Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science* **308**:385–389.
- KOENIG, S. & SIMIANER, H. (2006) Approaches to the management of inbreeding and relationship in the German Holstein dairy cattle population. *Livestock Science* **103**:40–53.
- KÜHN, C., THALLER, G., WINTER, A., BININDA-EMONDS, O. R., KAUPE, B., ERHARDT, G., BENNEWITZ, J., SCHWERIN, M., & FRIES, R. (2004) Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics* **167**(4):1873–1881.

KUSS, A. W., GOGOL, J., & GELDERMANN, H. (2003) Associations of a Polymorphic AP2 Binding Site in the 5'-Flanking Region of the Bovine beta-Lactoglobulin Gene with Milk Proteins. *Journal of Dairy Science* **86**:2213–2218.

LANGO ALLEN, H., ESTRADA, K., LETTRE, G., BERNDT, S. I., WEEDON, M. N., RIVADENEIRA, F., WILLER, C. J., JACKSON, A. U., VEDANTAM, S., RAYCHAUDHURI, S., FERREIRA, T., WOOD, A. R., WEYANT, R. J., SEGRÈ, A. V., SPELIOTES, E. K., WHEELER, E., SORANZO, N., PARK, J. H., YANG, J., GUDBJARTSSON, D., HEARD-COSTA, N. L., RANDALL, J. C., QI, L., VERNON SMITH, A., MÄGI, R., PASTINEN, T., LIANG, L., HEID, I. M., LUAN, J., THORLEIFSSON, G., WINKLER, T. W., GODDARD, M. E., SIN LO, K., PALMER, C., WORKALEMAHU, T., AULCHENKO, Y. S., JOHANSSON, A., ZILLIKENS, M. C., FEITOSA, M. F., ESKO, T., JOHNSON, T., KETKAR, S., KRAFT, P., MANGINO, M., PROKOPENKO, I., ABSHER, D., ALBRECHT, E., ERNST, F., GLAZER, N. L., HAYWARD, C., HOTTENGA, J. J., JACOBS, K. B., KNOWLES, J. W., KUTALIK, Z., MONDA, K. L., POLASEK, O., PREUSS, M., RAYNER, N. W., ROBERTSON, N. R., STEINTHORSDDOTTIR, V., TYRER, J. P., VOIGHT, B. F., WIKLUND, F., XU, J., ZHAO, J. H., NYHOLT, D. R., PELLIKKA, N., PEROLA, M., PERRY, J. R., SURAKKA, I., TAMMESOO, M. L., ALTMAIER, E. L., AMIN, N., ASPELUND, T., BHANGALE, T., BOUCHER, G., CHASMAN, D. I., CHEN, C., COIN, L., COOPER, M. N., DIXON, A. L., GIBSON, Q., GRUNDBERG, E., HAO, K., JUHANI JUNTILA, M., KAPLAN, L. M., KETTUNEN, J., KÖNIG, I. R., KWAN, T., LAWRENCE, R. W., LEVINSON, D. F., LORENTZON, M., MCKNIGHT, B., MORRIS, A. P., MÜLLER, M., SUH NGWA, J., PURCELL, S., RAFELT, S., SALEM, R. M., SALVI, E., SANNA, S., SHI, J., SOVIO, U., THOMPSON, J. R., TURCHIN, M. C., VANDENPUT, L., VERLAAN, D. J., VITART, V., WHITE, C. C., ZIEGLER, A., ALMGREN, P., BALMFORTH, A. J., CAMPBELL, H., CITTERIO, L., DE GRANDI, A., DOMINICZAK, A., DUAN, J., ELLIOTT, P., ELOSUA, R., ERIKSSON, J. G., FREIMER, N. B., GEUS, E. J., GLORIOSO, N., HAIQING, S., HARTIKAINEN, A. L., HAVULINNA, A. S., HICKS, A. A., HUI, J., IGL, W., ILLIG, T., JULA, A., KAJANTIE, E., KILPELÄINEN, T. O., KOIRANEN, M., KOLCIC, I., KOSKINEN, S., KOVACS, P., LAITINEN, J., LIU, J., LOKKI, M. L., MARUSIC, A., MASCHIO, A., MEITINGER, T., MULAS, A., PARÉ, G., PARKER, A. N., PEDEN, J. F., PETERSMANN, A., PICHLER, I., PIETILÄINEN, K. H., POUTA, A., RIDDERSTRÅLE, M., ROTTER, J. I., SAMBROOK, J. G., SANDERS, A. R., SCHMIDT, C. O., SINISALO, J., SMIT, J. H., STRINGHAM, H. M., BRAGI WALTERS, G., WIDEN, E., WILD, S. H., WILLEMSSEN, G., ZAGATO, L., ZGAGA, L., ZITTING, P., ALAVERE, H., FARRALL, M., MCARDLE, W. L., NELIS, M., PETERS, M. J., RIPATTI, S., VAN MEURS, J. B., ABEN, K. K., ARDLIE, K. G., BECKMANN, J. S., BEILBY, J. P., BERGMAN, R. N., BERGMANN, S., COLLINS, F. S., CUSI, D., DEN HEIJER, M., EIRIKSDOTTIR, G., GEJMAN, P. V., HALL, A. S., HAMSTEN, A., HUUKURI, H. V., IRIBARREN, C., KÄHÖNEN, M., KAPRIO, J., KATHIRESAN, S., KIEMENEY, L., KOCHER, T., LAUNER, L. J., LEHTIMÄKI, T., MELANDER, O., MOSLEY, T. H., MUSK, A. W., NIEMINEN, M. S., O'DONNELL, C. J., OHLSSON, C., OOSTRA, B., PALMER, L. J., RAITAKARI, O., RIDKER, P. M., RIOUX, J. D., RISSANEN, A., RIVOLTA, C., SCHUNKERT, H., SHULDINER, A. R., SISCOVICK, D. S., STUMVOLL, M., TÖNJES, A., TUOMILEHTO, J., VAN OMMEN, G. J., VIIKARI, J., HEATH, A. C., MARTIN, N. G., MONTGOMERY, G. W., PROVINCE, M. A., KAYSER, M., ARNOLD, A. M., ATWOOD, L. D., BOERWINKLE, E., CHANOCK,

S. J., DELOUKAS, P., GIEGER, C., GRÖNBERG, H., HALL, P., HATTERSLEY, A. T., HENGSTENBERG, C., HOFFMAN, W., LATHROP, G. M., SALOMAA, V., SCHREIBER, S., UDA, M., WATERWORTH, D., WRIGHT, A. F., ASSIMES, T. L., BARROSO, I., HOFMAN, A., MOHLKE, K. L., BOOMSMA, D. I., CAULFIELD, M. J., CUPPLES, L. A., ERDMANN, J., FOX, C. S., GUDNASON, V., GYLLENSTEN, U., HARRIS, T. B., HAYES, R. B., JARVELIN, M. R., MOOSER, V., MUNROE, P. B., OUWEHAND, W. H., PENNINX, B. W., PRAMSTALLER, P. P., QUERTERMOUS, T., RUDAN, I., SAMANI, N. J., SPECTOR, T. D., VÖLZKE, H., WATKINS, H., WILSON, J. F., GROOP, L. C., HARITUNIAN, T., HU, F. B., KAPLAN, R. C., METSPALU, A., NORTH, K. E., SCHLESSINGER, D., WAREHAM, N. J., HUNTER, D. J., O'CONNELL, J. R., STRACHAN, D. P., WICHMANN, H. E., BORECKI, I. B., VAN DUJN, C. M., SCHADT, E. E., THORSTEINSDOTTIR, U., PELTONEN, L., UITTERLINDEN, A. G., VISSCHER, P. M., CHATTERJEE, N., LOOS, R. J., BOEHNKE, M., MCCARTHY, M. I., INGELSSON, E., LINDGREN, C. M., ABECASIS, G. R., STEFANSSON, K., FRAYLING, T. M., & HIRSCHHORN, J. N. (2010) Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature* **467**(7317):832–838.

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**(21):2947–2948.

LAURIDSEN, A. L., VESTERGAARD, P., HERMANN, A. P., BROTH, C., HEICKENDORFF, L., MOSEKILDE, L., & NEXO, E. (2005) Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* **77**(1):15–22.

LEE, K. K., SHIMOJI, M., HOSSAIN, Q. S., SUNAKAWA, H., & ANIYA, Y. (2008) Novel function of glutathione transferase in rat liver mitochondrial membrane: Role for cytochrome c release from mitochondria. Some of the data were presented at the ISSX (International Society for Study of Xenobiotics) Meeting, Oct.12, 2007, in Sendai, Japan. *Toxicology and Applied Pharmacology* **232**:109–118.

LEWIS, S. E., SEARLE, S. M., 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**(12):RESEARCH0082.

LI, H. & DURBIN, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**(14):1754–1760.

LI, Y., WILLER, C., SANNA, S., & ABECASIS, G. (2009) Genotype imputation. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **10**:387–406.

LIEN, S., ROGNE, S., BROVOLD, M. J., & ALESTRÖM, P. (1990) A method for isolation of DNA from frozen (A.I.) bulls semen. *J Anim Breed Genet* **107**:74.

- LOKER, S., MIGLIOR, F., KOECK, A., NEUENSCHWANDER, T. F., BASTIN, C., JAMROZIK, J., SCHAEFFER, L. R., & KELTON, D. (2012) Relationship between body condition score and health traits in first-lactation Canadian Holsteins. *J Dairy Sci* **95**(11):6770–6780.
- LU, B., JIANG, Y. J., ZHOU, Y., XU, F. Y., HATCH, G. M., & CHOY, P. C. (2005) Cloning and characterization of murine 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate acyltransferases and their regulation by PPARalpha in murine heart. *Biochem J* **385**(Pt 2):469–477.
- LUCY, M. C., JIANG, H., & KOBAYASHI, Y. (2001) Changes in the Somatotrophic Axis Associated with the Initiation of Lactation1. *Journal of Dairy Science* **84**:E113–E119.
- LUM, L. S., DOVČ, P., & MEDRANO, J. F. (1997) Polymorphisms of Bovine beta-Lactoglobulin Promoter and Differences in the Binding Affinity of Activator Protein2 Transcription Factor. *Journal of Dairy Science* **80**:1389–1397.
- MACKAY, T. F. (2001) Quantitative trait loci in Drosophila. *Nat Rev Genet* **2**(1):11–20.
- MACLEOD, I. M., HAYES, B. J., SAVIN, K. W., CHAMBERLAIN, A. J., MCPARTLAN, H. C., & GODDARD, M. E. (2010) Power of a genome scan to detect and locate quantitative trait loci in cattle using dense single nucleotide polymorphisms. *J Anim Breed Genet* **127**(2):133–142.
- MAEDA, A., CRABB, J. W., & PALCZEWSKI, K. (2005) Microsomal glutathione S-transferase 1 in the retinal pigment epithelium: protection against oxidative stress and a potential role in aging. *Biochemistry* **44**(2):480–489.
- MAI, M. D., SAHANA, G., CHRISTIANSEN, F. B., & GULDBRANDTSEN, B. (2010) A genome-wide association study for milk production traits in Danish Jersey cattle using a 50K single nucleotide polymorphism chip. *J Anim Sci* **88**(11):3522–3528.
- MANTAMADIOTIS, T., KRETZ, O., RIDDER, S., BLECKMANN, S. C., BOCK, D., GRÖNE, H. J., MALATERRE, J., DWORKIN, S., RAMSAY, R. G., & SCHÜTZ, G. (2006) Hypothalamic 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein loss causes anterior pituitary hypoplasia and dwarfism in mice. *Mol Endocrinol* **20**(1):204–211.
- MARCHINI, J., CARDON, L. R., PHILLIPS, M. S., & DONNELLY, P. (2004) The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nat Genet* **36**(5):512–517.
- MARTIN, P., SZYMANOWSKA, M., ZWIERZCHOWSKI, L., & LEROUX, C. (2002) The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reprod Nutr Dev* **42**(5):433–459.
- MCGRATH, J. J., SAHA, S., BURNE, T. H., & EYLES, D. W. (2010) A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol* **121**(1-2):471–477.
- MCLEOD, J. F. & COOKE, N. E. (1989) The vitamin D-binding protein, alpha-fetoprotein, albumin multigene family: detection of transcripts in multiple tissues. *J Biol Chem* **264**(36):21.760–21.769.

- MEINERT, T. R., KORVER, S., & ARENDONK, J. A. M. V. (1989) Parameter Estimation of Milk Yield and Composition for 305 Days and Peak Production. *Journal of Dairy Science* **72**:1534–1539.
- MEUWISSEN, T. H., HAYES, B. J., & GODDARD, M. E. (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* **157**(4):1819–1829.
- MOE, P. W., TYRRELL, H. F., & FLATT, W. P. (1971) Energetics of body tissue mobilization. *J Dairy Sci* **54**(4):548–553.
- MOISIO, S., ELO, K., KANTANEN, J., & VILKKI, J. (1998) Polymorphism within the 3' flanking region of the bovine growth hormone receptor gene. *Anim Genet* **29**(1):55–57.
- MORRIS, C. A., CULLEN, N. G., GLASS, B. C., HYNDMAN, D. L., MANLEY, T. R., HICKEY, S. M., MCEWAN, J. C., PITCHFORD, W. S., BOTTEMA, C. D. K., & LEE, M. A. H. (2007) Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mammalian Genome* **18**:64–74.
- MOSIALOU, E., EKSTRÖM, G., ADANG, A. E., & MORGENSTERN, R. (1993) Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* **45**(8):1645–1651.
- NADEAU, J. H. (2001) Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* **2**(3):165–174.
- NAGLE, C. A., VERGNES, L., DEJONG, H., WANG, S., LEWIN, T. M., REUE, K., & COLEMAN, R. A. (2008) Identification of a novel sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform, GPAT4, as the enzyme deficient in *Agpat6*<sup>-/-</sup> mice. *J Lipid Res* **49**(4):823–831.
- NELSON, C. D., REINHARDT, T. A., LIPPOLIS, J. D., SACCO, R. E., & NONNECKE, B. J. (2012) Vitamin d signaling in the bovine immune system: a model for understanding human vitamin d requirements. *Nutrients* **4**(3):181–196.
- 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**(14):2745–2751.
- NOTTER, D. R. (1999) The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J Anim Sci* **77**(1):61–69.
- OLIVECRONA, G., EHRENBORG, E., SEMB, H., MAKOVEICHUK, E., LINDBERG, A., HAYDEN, M. R., GIN, P., DAVIES, B. S. J., WEINSTEIN, M. M., FONG, L. G., BEIGNEUX, A. P., YOUNG, S. G., OLIVECRONA, T., & HERNELL, O. (2010) Mutation of conserved cysteines in the Ly6 domain of GPIHBP1 in familial chylomicronemia. *Journal of Lipid Research* **51**(6):1535–1545.
- OLTENACU, P. A. & ALGERS, B. (2005) Selection for increased production and the welfare of dairy cows: are new breeding goals needed? *Ambio* **34**(4-5):311–315.

- ORDOVÁS, L., ROY, R., PAMPÍN, S., ZARAGOZA, P., OSTA, R., RODRÍGUEZ-REY, J. C., & RODELLAR, C. (2008) The g.763G>C SNP of the bovine FASN gene affects its promoter activity via Sp-mediated regulation: implications for the bovine lactating mammary gland. *Physiol Genomics* **34**(2):144–148.
- OSKOUIAN, B., RANGAN, V. S., & SMITH, S. (1997) Regulatory elements in the first intron of the rat fatty acid synthase gene. *Biochem J* **324** ( Pt 1):113–121.
- PANDER, B. L., HILL, W. G., & THOMPSON, R. (1992) Genetic parameters of test day records of British Holstein-Friesian heifers. *Animal Science* **55**(01):11–21.
- PARTIPILO, G., D'ADDABBO, P., LACALANDRA, G. M., LIU, G. E., & ROCCHI, M. (2011) Refinement of *Bos taurus* sequence assembly based on BAC-FISH experiments. *BMC Genomics* **12**:639–639.
- 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**(1):3–3.
- PAUSCH, H., JUNG, S., EDEL, C., EMMERLING, R., KROGMEIER, D., GÖTZ, K. U., & FRIES, R. (2012a) Genome-wide association study uncovers four QTL predisposing to supernumerary teats in cattle. *Anim Genet* **43**(6):689–695.
- PAUSCH, H., WANG, X., JUNG, S., KROGMEIER, D., EDEL, C., EMMERLING, R., GÖTZ, K. U., & FRIES, R. (2012b) Identification of QTL for UV-protective eye area pigmentation in cattle by progeny phenotyping and genome-wide association analysis. *PLoS One* **7**(5):e36.346.
- PAUSCH, H., WURMSER, C., JANSEN, S., AIGNER, B., & FRIES, R. (2012c) Imputation of whole-genome sequence information for QTL fine-mapping in the Fleckvieh population. *Book of Abstracts of the 33rd ISAG conference, Cairns* .
- PEARSON, T. A. & MANOLIO, T. A. (2008) How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* **299**(11):1335–1344.
- PEKALA, P. H., KAWAKAMI, M., ANGUS, C. W., LANE, M. D., & CERAMI, A. (1983) Selective inhibition of synthesis of enzymes for de novo fatty acid biosynthesis by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(9):2743–2747.
- PIMENTEL, E. C., BAUERSACHS, S., TIETZE, M., SIMIANER, H., TETENS, J., THALLER, G., REINHARDT, F., WOLF, E., & KÖNIG, S. (2011a) Exploration of relationships between production and fertility traits in dairy cattle via association studies of SNPs within candidate genes derived by expression profiling. *Anim Genet* **42**(3):251–262.
- PIMENTEL, E. D. A. C., ERBE, M., KÖNIG, S., & SIMIANER, H. (2011b) Genome partitioning of genetic variation for milk production and composition traits in holstein cattle. *Front Genet* **2**:19.

- PIRCHNER, F. (2002) Schätzung inzuchtwirksamer (effektiver ) Populationsgrößen aus Genfrequenzschwankungen bei Bayerischem Fleckvieh und Tiroler Grauvieh. *Archiv Tierzucht* **45**(4):331–339.
- PROSSER, C. G., TURNER, S.-A., MCLAREN, R. D., LANGLEY, B., L'HUILLIER, P. J., MOLAN, P., & AULDIST, M. J. (2000) Milk whey protein concentration and mRNA associated with beta-lactoglobulin phenotype. *Journal of Dairy Research* **67**:287–293.
- PURCELL, S., NEALE, B., TODD-BROWN, K., THOMAS, L., FERREIRA, M. A., BENDER, D., MALLER, J., SKLAR, P., DE BAKKER, P. I., DALY, M. J., & SHAM, P. C. (2007) PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics* **81**(3):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. *Nucleic Acids Research* **29**:159–164.
- RAKSHANDEHROO, M., KNOCH, B., MÜLLER, M., & KERSTEN, S. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res* **2010**.
- RAMJI, D. P. & FOKA, P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* **365**(Pt 3):561–575.
- RAUW, W., KANIS, E., NOORDHUIZEN-STASSEN, E., & GROMMERS, F. (1998) Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science* **56**(1):15–33.
- REESE, M. G. (2001) Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* **26**(1):51–56.
- REINHARDT, T. A. & HUSTMYER, F. G. (1987) Role of vitamin D in the immune system. *J Dairy Sci* **70**(5):952–962.
- REIST, M., ERDIN, D., VON EUW, D., TSCHUEMPERLIN, K., LEUENBERGER, H., CHILLIARD, Y., HAMMON, H. M., MOREL, C., PHILIPONA, C., ZBINDEN, Y., KUENZI, N., & BLUM, J. W. (2002) Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci* **85**(12):3314–3327.
- REUSCH, J. E., COLTON, L. A., & KLEMM, D. J. (2000) CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol* **20**(3):1008–1020.
- REUSCH, J. E. & KLEMM, D. J. (2002) Inhibition of cAMP-response element-binding protein activity decreases protein kinase B/Akt expression in 3T3-L1 adipocytes and induces apoptosis. *J Biol Chem* **277**(2):1426–1432.
- RISCH, N. J. (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* **405**(6788):847–856.

- RÖMER, A. (2011) Untersuchungen zur Nutzungsdauer bei Deutschen Holstein Kühen. *Züchtungskunde* **83**(1):8–20.
- ROSEN, J. M., WYSZOMIERSKI, S. L., & HADSELL, D. (1999) Regulation of milk protein gene expression. *Annu Rev Nutr* **19**:407–436.
- ROY, R., ORDOVAS, L., ZARAGOZA, P., ROMERO, A., MORENO, C., ALTARRIBA, J., & RODELLAR, C. (2006) Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk-fat content. *Anim Genet* **37**(3):215–218.
- ROY, R., TAOURIT, S., ZARAGOZA, P., EGGEN, A., & RODELLAR, C. (2005) Genomic structure and alternative transcript of bovine fatty acid synthase gene (FASN): comparative analysis of the FASN gene between monogastric and ruminant species. *Cytogenet Genome Res* **111**(1):65–73.
- ROZEN, S. & SKALETSKY, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**:365–386.
- RUDOLPH, M. C., MONKS, J., BURNS, V., PHISTRY, M., MARIANS, R., FOOTE, M. R., BAUMAN, D. E., ANDERSON, S. M., & NEVILLE, M. C. (2010) Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**(6):918–927.
- RUDOLPH, M. C., NEVILLE, M. C., & ANDERSON, S. M. (2007) Lipid synthesis in lactation: diet and the fatty acid switch. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**(4):269–281.
- SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12):5463–5467.
- SCHENNINK, A., BOVENHUIS, H., LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M., VAN ARENDONK, J. A., & VISKER, M. H. (2009) Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Anim Genet* **40**(6):909–916.
- SCHENNINK, A., STOOP, W. M., VISKER, M. H., HECK, J. M., BOVENHUIS, H., VAN DER POEL, J. J., VAN VALENBERG, H. J., & VAN ARENDONK, J. A. (2007) DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Anim Genet* **38**(5):467–473.
- SEEFRIED, F. (2008) Genomic Characterisation and Polymorphism Analysis of Candidate Genes for Milk Production Traits and Association Studies in Three Cattle Breeds. Ph.D. thesis, Technische Universität München.
- SMITH, S. J., CASES, S., JENSEN, D. R., CHEN, H. C., SANDE, E., TOW, B., SANAN, D. A., RABER, J., ECKEL, R. H., & FARESE, R. V. (2000) Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet* **25**(1):87–90.
- SODELAND, M., GROVE, H., KENT, M., TAYLOR, S., SVENDSEN, M., HAYES, B. J., & LIEN, S. (2011a) Molecular characterization of a long range haplotype affecting protein yield and mastitis susceptibility in Norwegian Red cattle. *BMC Genet* **12**:70.

SODELAND, M., KENT, M. P., OLSEN, H. G., OPSAL, M. A., SVENDSEN, M., SEHES-  
TED, E., HAYES, B. J., & LIEN, S. (2011b) Quantitative trait loci for clinical mastitis  
on chromosomes 2, 6, 14 and 20 in Norwegian Red cattle. *Anim Genet* **42**(5):457–465.

SONG, Y. H., RAY, K., LIEBHABER, S. A., & COOKE, N. E. (1998) Vitamin D-binding  
protein gene transcription is regulated by the relative abundance of hepatocyte nuclear  
factors 1alpha and 1beta. *J Biol Chem* **273**(43):28.408–28.418.

SONNENBURG, W. K., YU, D., LEE, E. C., XIONG, W., GOLOLOBOV, G., KEY, B.,  
GAY, J., WILGANOWSKI, N., HU, Y., ZHAO, S., SCHNEIDER, M., DING, Z. M., ZAM-  
BROWICZ, B. P., LANDES, G., POWELL, D. R., & DESAI, U. (2009) GPIHBP1 stabilizes  
lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4.  
*J Lipid Res* **50**(12):2421–2429.

SPEECKAERT, M., HUANG, G., DELANGHE, J. R., & TAES, Y. E. (2006) Biological  
and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism.  
*Clin Chim Acta* **372**(1-2):33–42.

SPELMAN, R. J., COPPIETERS, W., KARIM, L., VAN ARENDONK, J. A., & BOVENHUIS,  
H. (1996) Quantitative trait loci analysis for five milk production traits on chromosome  
six in the Dutch Holstein-Friesian population. *Genetics* **144**(4):1799–1808.

STAHL, E. A., RAYCHAUDHURI, S., REMMERS, E. F., XIE, G., EYRE, S., THOMSON,  
B. P., LI, Y., KURREEMAN, F. A., ZHERNAKOVA, A., HINKS, A., GUIDUCCI, C.,  
CHEN, R., ALFREDSSON, L., AMOS, C. I., ARDLIE, K. G., BIRAC CONSORTIUM,  
BARTON, A., BOWES, J., BROUWER, E., BURTT, N. P., CATANESE, J. J., COBLYN,  
J., COENEN, M. J., COSTENBADER, K. H., CRISWELL, L. A., CRUSIUS, J. B., CUI, J.,  
DE BAKKER, P. I., DE JAGER, P. L., DING, B., EMERY, P., FLYNN, E., HARRISON,  
P., HOCKING, L. J., HUIZINGA, T. W., KASTNER, D. L., KE, X., LEE, A. T., LIU,  
X., MARTIN, P., MORGAN, A. W., PADYUKOV, L., POSTHUMUS, M. D., RADSTAKE,  
T. R., REID, D. M., SEIELSTAD, M., SELDIN, M. F., SHADICK, N. A., STEER, S., TAK,  
P. P., THOMSON, W., VAN DER HELM-VAN MIL, A. H., VAN DER HORST-BRUIJNSMA,  
I. E., VAN DER SCHOOT, C. E., VAN RIEL, P. L., WEINBLATT, M. E., WILSON,  
A. G., WOLBINK, G. J., WORDSWORTH, B. P., YEAR CONSORTIUM, WIJMENGA, C.,  
KARLSON, E. W., TOES, R. E., DE VRIES, N., BEGOVICH, A. B., WORTHINGTON, J.,  
SIMINOVITCH, K. A., GREGERSEN, P. K., KLARESKOG, L., & PLENGE, R. M. (2010)  
Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis  
risk loci. *Nat Genet* **42**(6):508–514.

STANGASSINGER, M. (2007) Gibt es für Milchkühe eine Leistungsgrenze. In *8. Jahrestagung  
Poing (Grub)*.

STOOP, W. M., BOVENHUIS, H., HECK, J. M., & VAN ARENDONK, J. A. (2009) Effect  
of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *J  
Dairy Sci* **92**(4):1469–1478.

STOOP, W. M., VAN ARENDONK, J. A., HECK, J. M., VAN VALENBERG, H. J., &  
BOVENHUIS, H. (2008) Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production  
traits of Dutch Holstein-Friesians. *J Dairy Sci* **91**(1):385–394.

- STRANGER, B. E., STAHL, E. A., & RAJ, T. (2011) Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics* **187**(2):367–383.
- STRUCKEN, E. M., BORTFELDT, R. H., TETENS, J., THALLER, G., & BROCKMANN, G. A. (2011a) Genomweite Effekte auf Zuchtwerte abhängig vom Laktationsabschnitt in Holstein Friesians. *Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde eV und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften eV Freising-Weißenstephan*.
- STRUCKEN, E. M., BORTFELDT, R. H., TETENS, J., THALLER, G., & BROCKMANN, G. A. (2012) Genetic effects and correlations between production and fertility traits and their dependency on the lactation-stage in Holstein Friesians. *BMC Genet* **13**:108–108.
- STRUCKEN, E. M., DE KONING, D. J., RAHMATALLA, S. A., & BROCKMANN, G. A. (2011b) Lactation curve models for estimating gene effects over a timeline. *J Dairy Sci* **94**(1):442–449.
- SUMNER-THOMSON, J., VIERCK, J., & MCNAMARA, J. (2011) Differential expression of genes in adipose tissue of first-lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **94**(1):361 – 369.
- TOCCHETTI, A., SOPPO, C. B., ZANI, F., BIANCHI, F., GAGLIANI, M. C., POZZI, B., ROZMAN, J., ELVERT, R., EHRHARDT, N., RATHKOLB, B., MOERTH, C., HORSCH, M., FUCHS, H., GAILUS-DURNER, V., BECKERS, J., KLINGENSPOR, M., WOLF, E., HRABÉ DE ANGELIS, M., SCANZIANI, E., TACCHETTI, C., SCITA, G., DI FIORE, P. P., & OFFENHÄUSER, N. (2010) Loss of the actin remodeler Eps8 causes intestinal defects and improved metabolic status in mice. *PLoS One* **5**(3):e9468.
- VAN KNEGSEL, A., VAN DEN BRAND, H., DIJKSTRA, J., VAN STRAALEN, W., HEETKAMP, M., TAMMINGA, S., & KEMP, B. (2007) Dietary Energy Source in Dairy Cows in Early Lactation: Energy Partitioning and Milk Composition. *Journal of Dairy Science* **90**(3):1467–1476.
- VANRADEN, P. M. (2008) Efficient Methods to Compute Genomic Predictions. *Journal of Dairy Science* **91**(11):4414–4423.
- VANRADEN, P. M., O’CONNELL, J. R., WIGGANS, G. R., & WEIGEL, K. A. (2011) Genomic evaluations with many more genotypes. *Genet Sel Evol* **43**:10–10.
- VEERKAMP, R., BEERDA, B., & VAN DER LENDE, T. (2003) Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility. *Livestock Production Science* **83**:257–275.
- VELMALA, R., VILKKI, J., ELO, K., & MÄKI-TANILA, A. (1995) Casein haplotypes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle. *Anim Genet* **26**(6):419–425.
- VERGNES, L., BEIGNEUX, A. P., DAVIS, R., WATKINS, S. M., YOUNG, S. G., & REUE, K. (2006) Agpat6 deficiency causes subdermal lipodystrophy and resistance to obesity. *J Lipid Res* **47**(4):745–754.

- VIITALA, S., SZYDA, J., BLOTT, S., SCHULMAN, N., LIDAUER, M., MÄKI-TANILA, A., GEORGES, M., & VILKKI, J. (2006) The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Genetics* **173**(4):2151–2164.
- VONDERHAAR, B. K. & ZISKA, S. E. (1989) Hormonal regulation of milk protein gene expression. *Annu Rev Physiol* **51**:641–652.
- VOS, H. & GROEN, A. F. (1998) Altering milk protein/fat-ratio: results of a selection experiment in dairy cattle. *Livestock Production Science* **53**(1):49–55.
- WADE, K. & VLECK, L. V. (1989) Genetic Parameters for Production Traits of Holsteins in California, New York, and Wisconsin. *Journal of Dairy Science* **72**(5):1280–1285.
- WALLIS, G. (1938) Some Effects of a Vitamin D Deficiency on Mature Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **21**(6):315–333.
- 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**(7):e40.711.
- WANGLER, A., BLUM, E., BÖTTCHER, I., & P, S. (2009) Lebensleistung und Nutzungsdauer von Milchkühen aus der Sicht einer effizienten Milchproduktion. *Züchtungskunde* **81**(5):341–360.
- WARD, K. A., DAS, G., BERRY, J. L., ROBERTS, S. A., RAWER, R., ADAMS, J. E., & MUGHAL, Z. (2009) Vitamin D status and muscle function in post-menarchal adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(2):559–563.
- WATERHOUSE, A. M., PROCTER, J. B., MARTIN, D. M., CLAMP, M., & BARTON, G. J. (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**(9):1189–1191.
- WATERS, S. M., BERRY, D. P., & MULLEN, M. P. (2012) Polymorphisms in genes of the somatotrophic axis are independently associated with milk production, udder health, survival and animal size in Holstein-Friesian dairy cattle. *J Anim Breed Genet* **129**(1):70–78.
- WEIKARD, R., KÜHN, C., GOLDAMMER, T., FREYER, G., & SCHWERIN, M. (2005) The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol Genomics* **21**(1):1–13.
- WEIKARD, R., WIDMANN, P., BUITKAMP, J., EMMERLING, R., & KUEHN, C. (2012) Revisiting the quantitative trait loci for milk production traits on BTA6. *Anim Genet* **43**(3):318–323.
- WHITE, P. & COOKE, N. (2000) The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab* **11**(8):320–327.

- WILKENS, M. R., OBERHEIDE, I., SCHRÖDER, B., AZEM, E., STEINBERG, W., & BREVES, G. (2012) Influence of the combination of 25-hydroxyvitamin D3 and a diet negative in cation-anion difference on peripartal calcium homeostasis of dairy cows. *J Dairy Sci* **95**(1):151–164.
- WILLIAMS, M. H., VAN ALSTYNE, E. L., & GALBRAITH, R. M. (1988) Evidence of a novel association of unsaturated fatty acids with Gc (vitamin D-binding protein). *Biochem Biophys Res Commun* **153**(3):1019–1024.
- WINTER, A., KRÄMER, W., WERNER, F. A., KOLLERS, S., KATA, S., DURSTEWITZ, G., BUITKAMP, J., WOMACK, J. E., THALLER, G., & FRIES, R. (2002) Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14):9300–9305.
- WINTERS, S. J., CHENNUBHATLA, R., WANG, C., & MILLER, J. J. (2009) Influence of obesity on vitamin D-binding protein and 25-hydroxy vitamin D levels in African American and white women. *Metabolism* **58**(4):438–442.
- WJST, M., ALTMÜLLER, J., FAUS-KESSLER, T., BRAIG, C., BAHNWEG, M., & ANDRÉ, E. (2006) Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res* **7**:60.
- YANG, F., LI, L., LIU, H., CAI, Y., & WANG, G. (2012) Polymorphism in the exon 4 of beta-lactoglobulin variant B precursor gene and its association with milk traits and protein structure in Chinese Holstein. *Mol Biol Rep* **39**(4):3957–3964.
- YANG, J., LEE, S. H., GODDARD, M. E., & VISSCHER, P. M. (2011) GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *Am J Hum Genet* **88**(1):76–82.
- YOUNG, S. G., DAVIES, B. S., VOSS, C. V., GIN, P., WEINSTEIN, M. M., TONTONOV, P., REUE, K., BENSADOUN, A., FONG, L. G., & BEIGNEUX, A. P. (2011) GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J Lipid Res* **52**(11):1869–1884.
- ZEBELI, Q. & AMETAJ, B. N. (2009) Relationships between rumen lipopolysaccharide and mediators of inflammatory response with milk fat production and efficiency in dairy cows. *J Dairy Sci* **92**(8):3800–3809.
- ZIMIN, A. V., DELCHER, A. L., FLOREA, L., KELLEY, D. R., SCHATZ, M. C., PUIU, D., HANRAHAN, F., PERTEA, G., VAN TASSELL, C. P., SONSTEGARD, T. S., MARÇAIS, G., ROBERTS, M., SUBRAMANIAN, P., YORKE, J. A., & SALZBERG, S. L. (2009) A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol* **10**(4):R42.



## 9 Anhang

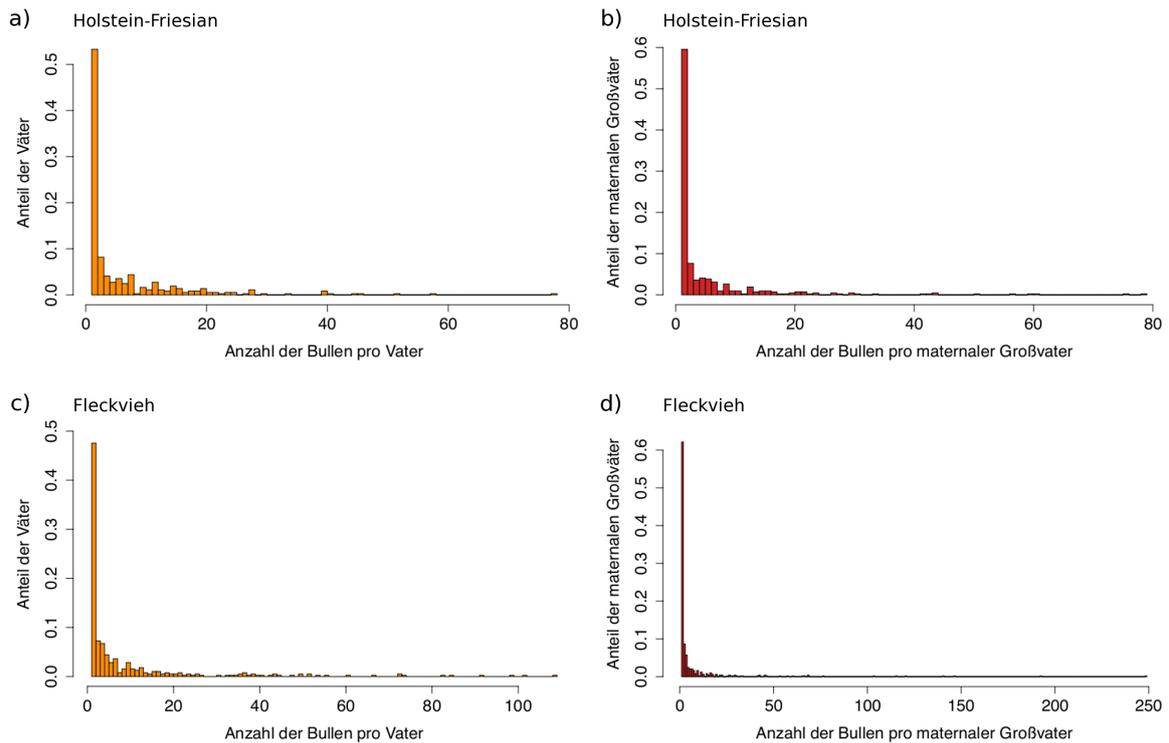


Abbildung 9.1: Verteilung der Väter und maternalen Großväter in der untersuchten Holstein-Friesian- (a) bzw. (b) und Fleckvieh-Population (c) bzw. (d). Dargestellt ist der Anteil der Väter bzw. maternalen Großväter für die unterschiedlich großen paternalen Halbgeschwisterfamilien bzw. maternalen Großvaterfamilien.

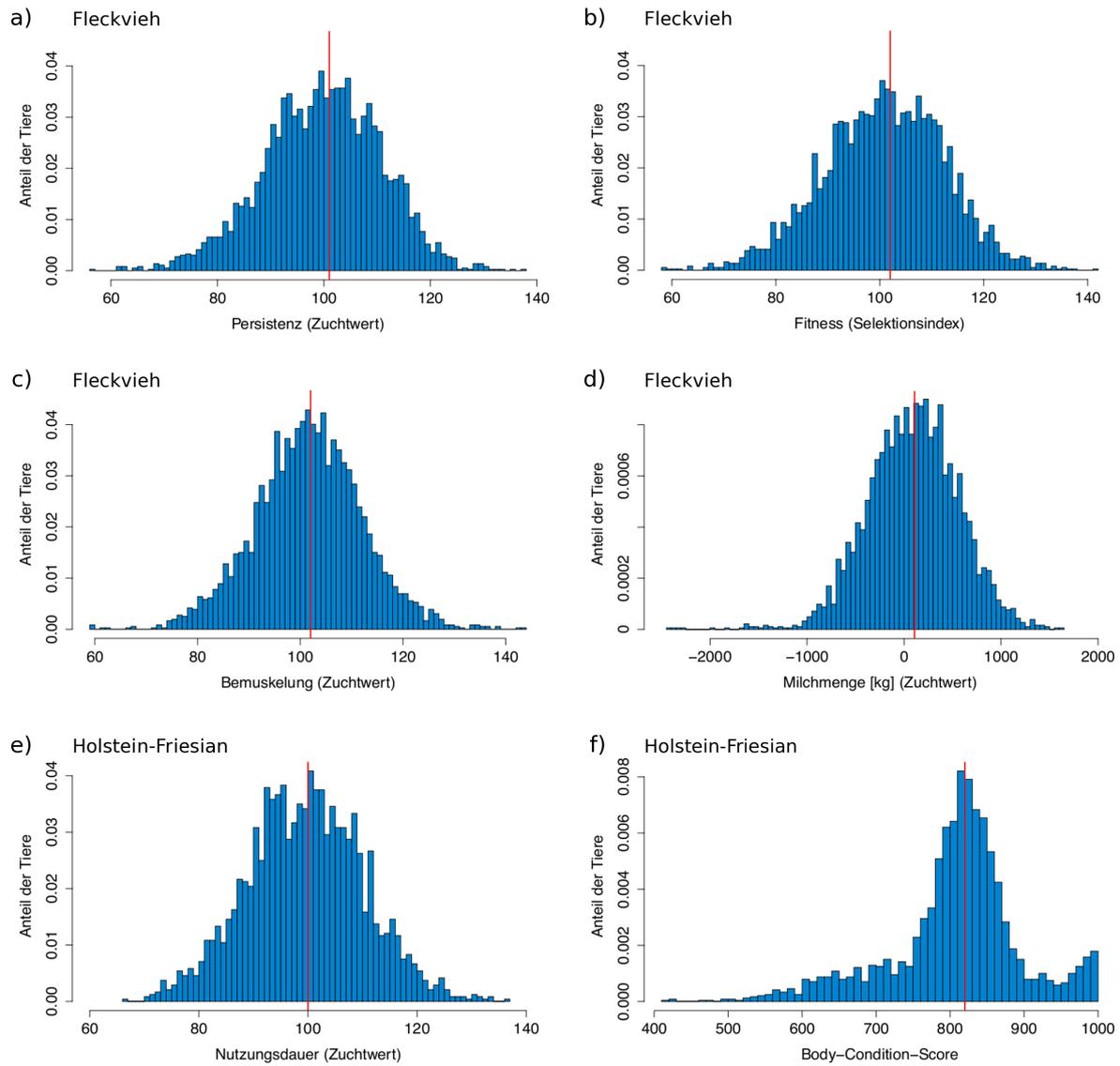


Abbildung 9.2: Verteilung der Phänotypen in den Versuchspopulationen für die Merkmale a) Persistenz, b) Fitness, c) Bemuskelung und d) Milchmenge bei der Rasse Fleckvieh sowie e) Nutzungsdauer und f) Body-Condition-Score bei der Rasse Holstein-Friesian. Die rote Linie kennzeichnet den jeweiligen Median.

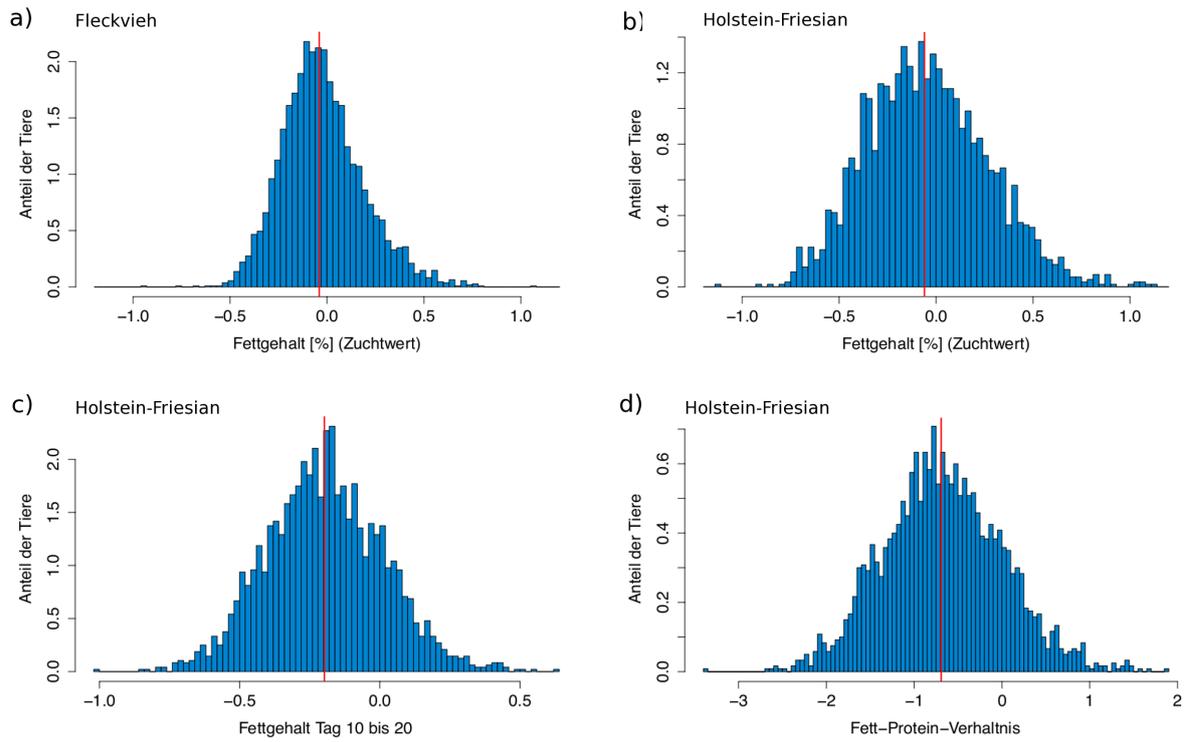


Abbildung 9.3: Verteilung der Phänotypen in den Versuchspopulationen für die Merkmale a) Fettgehalt-Zuchtwert der Rasse Fleckvieh und b) Fettgehalt-Zuchtwert, c) Fettgehalt der Laktationstage 10 bis 20 und d) Fett-Protein-Verhältnis der Laktationstage 10 bis 20 der Rasse Holstein-Friesian. Die rote Linie kennzeichnet den jeweiligen Median.

## 9 Anhang

*Tabelle 9.1: Tierpanel für das Screening nach Polymorphismen im GPAT4-Gen bei Holstein-Friesian. Bei der Berechnung des Zuchtwerts für den Fettgehalt, sowie für das Fett-Protein-Verhältnis wurden die ersten drei Laktationen gleich gewichtet.*

Tier-ID	LOM	Name	Rasse	Fettgehalt (Tag 10-20)	FPR (Tag 10-20)	ARS-BFGL- NGS-57448
KI-GT1880	380001260001217	LONZO	HF	-0,85	0,68	AA
KI-GT0726	276000346273875	FELS	HF	-0,73	0,76	AA
KI-GT0717	276000346469776	LEONAS	HF	-0,7	0,79	AA
KI-GT1432	840000126540309	DURMONT	HF	-0,65	0,81	AA
KI-GT1295	276001601409478	MANAGUA	HF	-0,38	0,94	AG
KI-GT0573	276000345885895	CASSO	HF	-0,27	0,95	AG
KI-GT0466	276000347903535	CAPRICIO	HF	0,23	1,32	GG
KI-GT0500	276000347481954	MAGNAT	HF	0,34	1,33	GG
KI-GT1207	276000345461865	LARRY	HF	0,41	1,36	GG
KI-GT1829	276001401400221	DOLMAN	HF	0,43	1,38	GG
KI-GT1490	276000347425027	CENTIMO	HF	0,44	1,35	GG
KI-GT0712	276000347450021	JANTHUR	HF	0,5	1,46	GG

*Tabelle 9.2: Tierpanel für das Screening nach Polymorphismen im GPIHBP1-Gen bei Holstein-Friesian. Bei der Auswahl der Tiere wurde darauf geachtet, alle Haplotypen der DGAT1-Variante in das Panel zu integrieren, um systematische Fehler zu vermeiden. Bei der Berechnung des Zuchtwerts für den Fettgehalt, sowie für das Fett-Protein-Verhältnis wurden die ersten drei Laktationen gleich gewichtet. Die Werte des DGAT1-Haplotypen geben an, ob der jeweilige Bulle den das AA-Allel beinhaltenden Haplotyp homozygot (2), heterozygot (1) oder nicht (0) trägt.*

Tier-ID	LOM	Name	Rasse	Fettgehalt (Tag 10-20)	FPR (Tag 10-20)	Hapmap30086- BTC-002066	DGAT1- Haplotyp
KI-GT1490	276000347425027	CENTIMO	HF	0,44	1,35	AA	2
KI-GT0948	528000257258539	WARRICK	HF	0,4	1,37	AA	1
KI-GT3031	276000532758340	WINDOR	HF	0,28	1,25	AA	0
KI-GT2634	276000113486115	NOG WOLKE	HF	0,22	1,21	AA	0
KI-GT2204	276000578503481	MAGREB	HF	0,26	1,11	AG	1
KI-GT2441	276000344295206	BONDARI	HF	-0,37	0,88	AG	0
KI-GT0971	276001400782886	MARINO	HF	-0,38	0,95	AG	0
KI-GT2420	840000129272500	HELLION	HF	-0,38	0,93	AG	1
KI-GT2121	276000345480763	GOLDSTERN	HF	-0,52	0,74	GG	1
KI-GT1523	276001401956638	EDITOR	HF	-0,53	0,8	GG	1
KI-GT3113	840000207124561	MODEST	HF	-0,73	0,75	GG	0
KI-GT1000	276000344956122	MORELLO	HF	-1,02	0,53	GG	0

*Tabelle 9.3: Tierpanel für das Screening nach Polymorphismen im GC-Gen bei Holstein-Friesian.*

Tier-ID	LOM	Name	Rasse	RZN	BCS	BTB-01654826
KI-GT0490	276000347764065	JEDWAY	HF	91	791	AA
KI-GT0488	276000812456429	JURKY	HF	95	850	AA
KI-GT0474	276000346668325	JUOMO	HF	104	820	AA
KI-GT0494	276000767764595	JOCTON	HF	116	811	AA
KI-GT0500	276000347481954	MAGNAT	HF	89	851	AG
KI-GT0294	276000579326185	LUCERO	HF	93	840	AG
KI-GT0499	276000345859157	NOG MOREIF	HF	97	771	AG
KI-GT0400	276000346830476	EMENZ	HF	107	830	AG
KI-GT0330	276000347821681	NOG MANOTO	HF	99	821	GG
KI-GT0329	276000347448870	CYMBALL	HF	102	761	GG
KI-GT0495	276000345611978	ULTIMATUM	HF	106	770	GG
KI-GT0455	276000812180202	FOLEE	HF	111	881	GG

Tabelle 9.4: Fleckvieh-Gründertiere der Next-Generation-Sequenzierung

Tiername	LOM	detektierte SNP	Abdeckung
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

Tabelle 9.5: Übersicht über die bei der Resequenzierung der Kandidatengene *GPAT4*, *GPIHBP1* und *GC* verwendeten Oligonukleotide

Gen	Primer	Richtung	Sequenz	Region	Fragmentlänge in bp	Annealingtemperatur in °C
GPAT4	8929	forward	AAGTCAAAGCAAAGTCGGTCA			
GPAT4	8930	reverse	TGGTCACGTATGGATGTGAGA	5'-flankierend	600	60
GPAT4	8931	forward	TCCAATGAACACCCAGGACT			
GPAT4	8932	reverse	ATTGCAGGGGAAAAGGAAAT	5'-flankierend	517	54
GPAT4	8933	forward	CCACTGTTGCCCATCTATT			
GPAT4	8934	reverse	GATGCTTCCTGAGACGTTC	5'-flankierend	519	60
GPAT4	8935	forward	TAACCGATTACGGAGCATT			
GPAT4	8936	reverse	GGTTTGTCCACCCTACATGG	5'-flankierend	581	60
GPAT4	8937	forward	TGGGTTAGTTTGTGCTGTGC			
GPAT4	8938	reverse	GCTCCTCTGGATGCTCCTC	5'-flankierend	531	60
GPAT4	8939	forward	GACCTTGGGGATGAGAGGAG			
GPAT4	8940	reverse	TGCCAGAAAAGCGTATAA	5'-flankierend	507	60
GPAT4	8941	forward	GGGCAGTATGAGCCATTCC			
GPAT4	8942	reverse	CAGAGGGTGAGAGCTGAAGG	5'-flankierend	520	60
GPAT4	8943	forward	TCTTGGGCAGGAGATACAGG			
GPAT4	8944	reverse	TTGGCTAACGGCACTTCTCT	Exon 1	546	60
GPAT4	8945	forward	TCTGATCTGGGGTGACTGG			
GPAT4	8946	reverse	GGCAGTAGCGGATGAGTACG	Exon 2	589	60
GPAT4	8947	forward	CAAAAGACCCACGTCCTA			
GPAT4	8948	reverse	GGGATCAATACGCCTCTGTC	Exon 3	581	60
GPAT4	8949	forward	TTGGACCCTACTTCTGCTG			
GPAT4	8950	reverse	GCTGCCGAGTCAGTTACCAT	Exon 4	530	60
GPAT4	8951	forward	GGCAGCAGTGGTTAGATGGT			
GPAT4	8952	reverse	CCCAGGTCTGAAAACACACT	Exon 5 und 6	501	60
GPAT4	8953	forward	CGGTTCTTTGTAGGGTTTTCA			
GPAT4	8954	reverse	GCGCTTTATTCTATTGTGGA	Exon 7	595	60
GPAT4	8955	forward	TGTTTCATTAGCCTGCCTTCA			
GPAT4	8956	reverse	CGGTCCTTTACCCAGAGAT	Exon 8	537	60
GPAT4	8957	forward	CTGGGGAGATGACAGGCTTA			
GPAT4	8958	reverse	GTGAGCCAAAAGCAGAGAGT	Exon 9	499	60
GPAT4	8959	forward	TTGTTACAGACCCATGCAG			
GPAT4	8960	reverse	AGCAACCGCCTCAGAAATC	Exon 10	505	60
GPAT4	8961	forward	CTTGCAGGCAGAGGAGGAT			
GPAT4	8962	reverse	GTGGGGAGGGACTTTAATGG	Exon 11 und 12	506	60
GPAT4	8963	forward	GTTCAAGGAGGAGCAGAGA			
GPAT4	8964	reverse	ACAGGAACGAACCCCAAAC	3'-flankierend	590	60
GPAT4	8965	forward	ACTGGTCCCCAGCTCAGT			
GPAT4	8966	reverse	TTCCAGATCGTCTCCTACCC	3'-flankierend	522	60
GPAT4	8967	forward	GATGCTGCTGGGAAGAAGG			
GPAT4	8968	reverse	AGGAGATGCCGCTGTAGT	3'-flankierend	561	60
GPAT4	8969	forward	ACTGGCTTACTGGGTTTCAG			
GPAT4	8970	reverse	TGAGAAAACGAAAACCGACA	3'-flankierend	597	60
<hr/>						
GPIHBP1	9457	forward	CCTGCTCCCTAACACTGCTG			
GPIHBP1	9458	reverse	GGCTTCTCCCTGAACCTGC	5' flanking	614	60
GPIHBP1	9459	forward	ATGCTTGGTGGCTGAGACTG			
GPIHBP1	9460	reverse	CCCTGCGGCTAATGTCTAAC	5' flanking	593	60
GPIHBP1	9461	forward	CCAGGAAGGGTCTCCTCAGT			
GPIHBP1	9462	reverse	ATCGTGGGTGAGTGACAGG	5' flanking	616	60
GPIHBP1	9463	forward	CAACCTCTAGTAAACCCAGCTCA			
GPIHBP1	9464	reverse	AGGGGCCTTGTTAAGAGCAT	5' flanking	644	60
GPIHBP1	9465	forward	ACCTCCTGGGTTGAAGCTCT			
GPIHBP1	9466	reverse	GGCTCTGAATCTGTGGGAAG	5' flanking	609	60
GPIHBP1	9467	forward	AACCGCTCAGGTGGACAG			
GPIHBP1	9468	reverse	CCCTTCACAGCCCCCTACT	Exon 1	617	60
GPIHBP1	9469	forward	AGGTCAGAGGGACTGGGAAG			
GPIHBP1	9470	reverse	CCTCACCAGGACAGTTGTGT	Exon 2	625	60
GPIHBP1	9471	forward	AGATAAGGGGGCCAGTCCT			
GPIHBP1	9472	reverse	CAGCAGGATATGGTCGTCAG	Exon 3	515	60
GPIHBP1	9473	forward	ACCTGACCCGCTCTCTCC			
GPIHBP1	9474	reverse	CAAGAAGTTGGGAGCAAAT	Exon 4	607	60
GPIHBP1	9475	forward	ACTGGAAGCACCTGTGATGA			
GPIHBP1	9476	reverse	CAGCCCTCTCTTTCCCACTC	3' flanking	638	60

Tabelle 9.5: Übersicht über die bei der Resequenzierung der Kandidatengene *GPAT4*, *GPIHBP1* und *GC* verwendeten Oligonukleotide

Gen	Primer	Richtung	Sequenz	Region	Fragmentlänge in bp	Annealingtemperatur in °C
GPIHBP1	9477	forward	GCTTGGGGTGAATGGAATTA	3' flanking	621	60
GPIHBP1	9478	reverse	CGTTGTCCACCGGCTAT			
GPIHBP1	9479	forward	ACCGTATGTTTTCCCTTTCC	3' flanking	599	60
GPIHBP1	9480	reverse	CGCTGACACACAAAATGGAC			
GC	8845	forward	AGAGCTGGTGTACCCAAACC	5' flanking	516	60
GC	8846	reverse	GCAAAGCTTGCGTTCCTTAG			
GC	8847	forward	TAAGTGCCTGTGCCTCTCTG	5' flanking	543	60
GC	8848	reverse	GTGCATTTTTCCCTCCCTCTT			
GC	8849	forward	GGTTCTCACTTTTCCCCCTTA	Exon 1	551	60
GC	8850	reverse	TGCACAAAGGCTACAGCAAG			
GC	8851	forward	ATGACTGCCCTTGCTTCTGT	Exon 1	496	60
GC	8852	reverse	TGGATCACAACTCCCTCTG			
GC	8853	forward	AAGAAGGCACCCCCAAAAT	Exon 2	581	60
GC	8854	reverse	CCCCTGAAGCTGAATTGAAG			
GC	8855	forward	GGAACCCCTCAACTCCATCT	Exon 3	623	60
GC	8856	reverse	CAGGTATGCGTATTGGTAGGC			
GC	8857	forward	AGTCACACACCATCCACTCA	Exon 4	592	60
GC	8858	reverse	TGGGCTGTCTTGGGTTACAG			
GC	8859	forward	TTTTCTTGACTCGCAGACTTGA	Exon 5	645	60
GC	8860	reverse	CAGGATACATTGAAAGCAGTGTG			
GC	8861	forward	AGCAACTCTGGGGGAAATGT	Exon 6	593	60
GC	8862	reverse	ATGGGCAAAGCAAGTAATGG			
GC	8863	forward	GGCTTGCTTCAGCTACAAAAA	Exon 7	649	60
GC	8864	reverse	GGATATGCTCTGGGCTCTGT			
GC	8865	forward	CAGCAGCAGCAGTACCTTGT	Exon 8	534	60
GC	8866	reverse	GATTTTGGGGGCTGTAAAT			
GC	8867	forward	AAACGTGTTGGAGTCATTTTTAG	Exon 9	481	60
GC	8868	reverse	ACATGGCACAAAAGCAACTAT			
GC	8869	forward	AGGAGTTTTATAGTTTCTGATCTTACG	Exon 10	649	60
GC	8870	reverse	ATGTCCCTGTGGATCTTGGAA			
GC	8871	forward	CTCAGCAGCAGGTTGTATGTTT	Exon 11	636	60
GC	8872	reverse	TCCTTGGAATTGGCATTACT			
GC	8873	forward	TGCCATTGTCTTCTCCAAATAA	Exon 12	606	60
GC	8874	reverse	GGAATGTCGTTTTCTCCTG			
GC	8875	forward	GGGCCAGAGAGGATACAGG	Exon 13	522	60
GC	8876	reverse	AAGACTGAGATGCAATCAAGC			
GC	8877	forward	TGATGTTAAGCGTGATGATTTGT	3' flanking	604	60
GC	8878	reverse	CCTGGGCAAAGTAAGCATGT			
GC	9085	forward	CCTCCTGTGGATATTTTTCTTGC	3' flanking	607	60
GC	9086	reverse	CCTTTTGGAATCTGTGTGAGG			
GC	9087	forward	CCTAGTCCCCAGCCCAGTA	3' flanking	521	60
GC	9088	reverse	GTTGATGGCTTTTCCTTCCA			
GC	9089	forward	TGACCTTAACTCTGCATTTTTACA	3' flanking	558	60
GC	9090	reverse	TCAGCAGTAGAAGCAACAGCA			

Tabelle 9.6: Genstruktur der Kandidatengene *GPAT4*, *GPIHBP1* und *GC*. Die intronische Sequenz ist in Kleinbuchstaben, die Exonsequenz in Großbuchstaben dargestellt.

Gen	Nr.	Exonlänge	Position (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor ... 5'-Spleiß-Donor
<i>GPIHBP1</i>	1	467	2.552.580 – 2.552.113	agctgACTCG...GCAAGgtgcg
<i>GPIHBP1</i>	2	116	2.551.571 – 2.551.455	gccagGGAGA...CTCAGgtacc
<i>GPIHBP1</i>	3	110	2.550.837 – 2.550.727	cccagGGCCG...CACTGgtgag
<i>GPIHBP1</i>	4	355	2.550.623 – 2.550.268	cacagAGTCA...GATGAccccc
<i>GPAT4</i>	1	1000	36.211.800 – 36.212.799	gcctCCCCT...TTGCGgtgag
<i>GPAT4</i>	2	70	36.220.385 – 36.220.454	tgcagTGGGC...CAATGgtaag
<i>GPAT4</i>	3	301	36.220.586 – 36.220.886	tgcagGAATC...CTCAGgtgag
<i>GPAT4</i>	4	75	36.221.569 – 36.221.643	tacagGATAG...GGGAGgtgag
<i>GPAT4</i>	5	90	36.222.395 – 36.222.484	cgcagGTTCA...GACAGgtgag
<i>GPAT4</i>	6	94	36.222.622 – 36.222.715	aacagGAAGA...CCATGgtaag
<i>GPAT4</i>	7	116	36.223.362 – 36.223.477	agcagGTGGG...AGAAGgtaaa
<i>GPAT4</i>	8	56	36.224.201 – 36.224.256	tgcagGCTGA...AGAGGgtaag
<i>GPAT4</i>	9	86	36.224.650 – 36.224.735	tttagGAACC...TCAAGgtagg
<i>GPAT4</i>	10	129	36.227.886 – 36.228.014	cgcagTATGA...GACAGgtggg
<i>GPAT4</i>	11	80	36.228.098 – 36.228.177	tgcagGCAGA...CTGTGgtgag
<i>GPAT4</i>	12	658	36.228.357 – 36.229.014	gtcagGGACG...ACTGAatcga
<i>GC</i>	1	308	88.739.367 – 88.739.059	tttgaCAAAG...GAGAGgtaag
<i>GC</i>	2	70	88.723.052 – 88.722.983	gttagGCCGA...TCTTTgtaag
<i>GC</i>	3	133	88.722.131 – 88.721.999	ctcagGTCAA...ACAGGgtagg
<i>GC</i>	4	212	88.719.977 – 88.719.766	cctagACTTC...GATCGgtaag
<i>GC</i>	5	133	88.716.851 – 88.716.719	tacagATTTA...AAGAGgtagg
<i>GC</i>	6	95	88.716.410 – 88.716.316	tctagAGACT...CTCAGgtaaa
<i>GC</i>	7	127	88.714.625 – 88.714.499	ttcagCCATC...AGGAGgtaag
<i>GC</i>	8	203	88.712.829 – 88.712.627	tgtagCTTCC...GATCAgtaag
<i>GC</i>	9	130	88.711.913 – 88.711.784	gccagGTATA...CAAAGgtaca
<i>GC</i>	10	98	88.709.880 – 88.709.783	tacagGGCCG...AAAAAgtaag
<i>GC</i>	11	133	88.707.891 – 88.707.759	ttcagACTGG...CAGAGgtaag
<i>GC</i>	12	52	88.701.039 – 88.700.988	ttcagATTGA...CTTAAgtaag
<i>GC</i>	13	180	88.696.111 – 88.695.932	cacagACCTC...AATGctact

## 9 Anhang

Table 9.7: Anteil der durch die einzelnen Chromosomen bzw. QTL erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal FPro-ZW bei HF. Für BTA5, 14, 20 und 27 ist jeweils der Anteil an Varianz des Chromosoms abzüglich des durch den QTL erklärten Anteils angegeben.

Chromosom/QTL	Anteil an Zuchtwert-Varianz [%]	Standardfehler	Anteil an additiv-genetischer Varianz [%]
BTA1	0,83	0,45	0,96
BTA2	2,08	0,69	2,38
BTA3	2,22	0,73	2,55
BTA4	1,05	0,52	1,20
<i>EPS8</i> -Locus	8,29	2,54	9,52
BTA5	3,14	0,93	3,61
BTA6	0,98	0,48	1,13
BTA7	0,75	0,41	0,87
BTA8	1,47	0,58	1,69
BTA9	1,05	0,50	1,20
BTA10	1,87	0,68	2,15
BTA11	2,98	0,83	3,42
BTA12	2,08	0,68	2,39
BTA13	0,59	0,36	0,68
<i>DGAT1</i> -Locus	32,81	6,09	37,65
BTA14	2,41	0,78	2,77
BTA15	1,66	0,61	1,91
BTA16	1,15	0,53	1,32
BTA17	1,18	0,52	1,35
BTA18	0,73	0,41	0,83
BTA19	2,10	0,69	2,41
<i>GHR</i> -Locus	6,79	2,56	7,79
BTA20	0,93	0,57	1,07
BTA21	0,44	0,35	0,50
BTA22	0,73	0,42	0,83
BTA23	0,76	0,45	0,88
BTA24	0,91	0,46	1,05
BTA25	0,49	0,36	0,57
BTA26	0,49	0,31	0,56
<i>GPAT4</i> -Locus	0,81	0,39	0,93
BTA27	0,27	0,30	0,31
BTA28	0,45	0,34	0,52
BTA29	0,96	0,47	1,11
BTX	1,66	0,57	1,91

Tabelle 9.8: Anteil der durch die einzelnen Chromosomen bzw. QTL erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal *FPro10-20* bei HF. Für BTA5, 14, 20 und 27 ist jeweils der Anteil an erklärter Varianz des Chromosoms abzüglich des durch den QTL erklärten Anteils angegeben.

Chromosom/QTL	Anteil an Zuchtwert-Varianz [%]	Standardfehler	Anteil an additiv-genetischer Varianz [%]
BTA1	0,62	0,55	0,76
BTA2	2,24	0,80	2,76
BTA3	5,48	1,32	6,77
BTA4	3,07	0,99	3,79
<i>EPS8</i> -Locus	0,89	0,56	1,09
BTA5	2,50	0,91	3,09
BTA6	1,26	0,66	1,56
BTA7	2,96	1,00	3,66
BTA8	2,69	0,95	3,32
BTA9	3,07	0,98	3,79
BTA10	1,78	0,80	2,20
BTA11	2,25	0,85	2,78
BTA12	2,92	0,98	3,61
BTA13	1,79	0,79	2,21
<i>DGAT1</i> -Locus	15,65	4,19	19,32
BTA14	2,08	0,82	2,57
BTA15	1,83	0,76	2,26
BTA16	3,13	1,05	3,87
BTA17	1,36	0,64	1,68
BTA18	1,38	0,67	1,71
BTA19	1,46	0,71	1,80
<i>GHR</i> -Locus	1,11	0,77	1,36
BTA20	2,72	1,08	3,36
BTA21	0,80	0,52	0,99
BTA22	0,88	0,56	1,08
BTA23	2,20	0,87	2,72
BTA24	1,22	0,63	1,51
BTA25	0,15	0,38	0,19
BTA26	1,04	0,54	1,28
<i>GPAT4</i> -Locus	3,77	1,31	4,65
BTA27	1,68	0,86	2,07
BTA28	0,29	0,40	0,36
BTA29	1,16	0,59	1,44
BTX	3,26	0,98	4,02

## 9 Anhang

Table 9.9: Anteil der durch die einzelnen Chromosomen bzw. QTL erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal *FPro-ZW* bei *FV*. Für *BTA5*, *6*, *11*, *14*, *19*, *20* und *27* ist jeweils der Anteil an erklärter Varianz des Chromosoms abzüglich des durch den QTL erklärten Anteils angegeben.

Chromosom/QTL	Anteil an Zuchtwert-Varianz [%]	Standardfehler	Anteil an additiv-genetischer Varianz [%]
BTA1	1,17	0,38	1,26
BTA2	1,19	0,39	1,28
BTA3	1,37	0,42	1,47
BTA4	1,18	0,39	1,27
<i>EPS8-/MGST1</i> -Locus	2,00	0,76	2,14
BTA5	3,25	0,72	3,48
<i>CSN</i> -Locus	1,55	0,54	1,66
BTA6	1,04	0,42	1,12
BTA7	2,30	0,56	2,47
BTA8	1,78	0,46	1,91
BTA9	0,87	0,34	0,93
BTA10	1,24	0,40	1,33
<i>PAEP</i> -Locus	1,17	0,42	1,26
BTA11	1,91	0,50	2,04
BTA12	1,64	0,44	1,76
BTA13	1,82	0,48	1,95
<i>DGAT1</i> -Locus	47,25	4,08	50,61
BTA14	0,82	0,36	0,88
BTA15	2,73	0,60	2,92
BTA16	1,93	0,50	2,07
BTA17	1,29	0,40	1,38
BTA18	0,52	0,27	0,55
<i>FASN</i> -Locus	1,02	0,39	1,09
BTA19	1,44	0,45	1,54
<i>GHR</i> -Locus	2,70	0,89	2,89
BTA20	1,51	0,48	1,61
BTA21	1,14	0,38	1,22
BTA22	0,50	0,27	0,54
BTA23	0,59	0,29	0,64
BTA24	0,62	0,29	0,66
BTA25	0,29	0,20	0,31
BTA26	0,77	0,33	0,82
<i>GPAT4</i> -Locus	0,68	0,31	0,72
BTA27	0,31	0,25	0,34
BTA28	0,48	0,26	0,51
BTA29	0,35	0,24	0,37
BTX	0,94	0,32	1,01

Table 9.10: Anteil der durch die einzelnen Chromosomen bzw. QTL erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal *FPro20* bei *FV*. Für *BTA5*, *6*, *11*, *14*, *19*, *20* und *27* ist jeweils der Anteil an erklärter Varianz des Chromosoms abzüglich des durch den QTL erklärten Anteils angegeben.

Chromosom/QTL	Anteil an Zuchtwert-Varianz [%]	Standardfehler	Anteil an additiv-genetischer Varianz [%]
BTA1	1,03	0,44	1,15
BTA2	1,29	0,47	1,44
BTA3	2,99	0,69	3,34
BTA4	1,66	0,52	1,86
<i>EPS8-/MGST1</i> -Locus	0,26	0,26	0,29
BTA5	3,82	0,86	4,27
<i>CSN</i> -Locus	1,14	0,49	1,27
BTA6	1,25	0,55	1,40
BTA7	3,70	0,79	4,14
BTA8	2,09	0,62	2,34
BTA9	1,41	0,49	1,58
BTA10	0,81	0,43	0,91
<i>PAEP</i> -Locus	1,31	0,50	1,47
BTA11	2,49	0,69	2,79
BTA12	1,59	0,51	1,77
BTA13	3,14	0,72	3,51
<i>DGAT1</i> -Locus	33,17	4,01	37,11
BTA14	2,14	0,63	2,39
BTA15	2,22	0,61	2,48
BTA16	2,82	0,68	3,15
BTA17	0,96	0,43	1,07
BTA18	0,50	0,32	0,56
<i>FASN</i> -Locus	1,38	0,50	1,54
BTA19	1,34	0,50	1,49
<i>GHR</i> -Locus	0,63	0,39	0,71
BTA20	1,74	0,56	1,95
BTA21	1,31	0,46	1,47
BTA22	0,61	0,35	0,68
BTA23	0,87	0,40	0,98
BTA24	1,21	0,46	1,36
BTA25	0,79	0,35	0,88
BTA26	0,61	0,34	0,68
<i>GPAT4</i> -Locus	3,11	0,91	3,48
BTA27	0,43	0,34	0,48
BTA28	0,39	0,29	0,44
BTA29	0,83	0,40	0,93
BTX	2,35	0,59	2,63

Table 9.11: Anteil der durch die einzelnen Chromosomen bzw. QTL erklärten Zuchtwert-Varianz und additiv-genetischen Varianz für das Merkmal *FPro200* bei *FV*. Für *BTA5*, *6*, *11*, *14*, *19*, *20* und *27* ist jeweils der Anteil an erklärter Varianz des Chromosoms abzüglich des durch den QTL erklärten Anteils angegeben.

Chromosom/QTL	Anteil an Zuchtwert-Varianz [%]	Standardfehler	Anteil an additiv-genetischer Varianz [%]
BTA1	1,82	0,50	2,00
BTA2	1,33	0,45	1,46
BTA3	1,18	0,41	1,30
BTA4	1,04	0,39	1,14
<i>EPS8-/MGST1</i> -Locus	3,51	1,11	3,86
BTA5	2,82	0,71	3,10
<i>CSN</i> -Locus	2,03	0,66	2,24
BTA6	0,87	0,41	0,95
BTA7	2,64	0,63	2,91
BTA8	1,55	0,44	1,70
BTA9	0,97	0,38	1,07
BTA10	2,15	0,54	2,36
<i>PAEP</i> -Locus	1,20	0,45	1,32
BTA11	1,70	0,49	1,87
BTA12	1,87	0,50	2,06
BTA13	1,42	0,44	1,56
<i>DGAT1</i> -Locus	41,44	4,19	45,60
BTA14	0,97	0,40	1,07
BTA15	2,49	0,59	2,74
BTA16	2,05	0,54	2,25
BTA17	1,08	0,39	1,18
BTA18	0,22	0,22	0,25
<i>FASN</i> -Locus	0,77	0,34	0,85
BTA19	1,37	0,47	1,51
<i>GHR</i> -Locus	4,88	1,38	5,37
BTA20	1,37	0,51	1,51
BTA21	0,69	0,31	0,76
BTA22	0,41	0,27	0,45
BTA23	0,72	0,34	0,79
BTA24	0,46	0,28	0,50
BTA25	0,43	0,24	0,47
BTA26	1,08	0,42	1,18
<i>GPAT4</i> -Locus	0,09	0,15	0,09
BTA27	0,22	0,24	0,24
BTA28	0,73	0,31	0,81
BTA29	0,62	0,31	0,68
BTX	0,72	0,31	0,79

Tabelle 9.12: SNP des PAEP-Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA11)	Region	Allele	MAF	LD (als $r^2$ ) mit ARS-BFGL-NGS-31097	LD (als $r^2$ ) mit PAEP_45	Abdeckung
PAEP_1	ss687005949	103299687	5'-flankierend	C>T	C (0,48)	0,57	0,74	5,07
PAEP_2	ss687005950	103299696	5'-flankierend	T>C	T (0,49)	0,53	0,70	5,07
PAEP_3	ss687005951	103299747	5'-flankierend	C>T	C (0,49)	0,53	0,70	4,81
PAEP_4	ss687005952	103299801	5'-flankierend	T>C	C (0,50)	0,49	0,67	4,74
PAEP_5	ss687005953	103299815	5'-flankierend	A>C	C (0,40)	0,35	0,42	4,58
PAEP_6	ss687005954	103299858	5'-flankierend	G>C	G (0,48)	0,49	0,74	4,44
PAEP_7	ss687005955	103299916	5'-flankierend	G>C	T (0,45)	0,57	0,73	4,53
PAEP_8	ss687005956	103299937	5'-flankierend	T>C	T (0,45)	0,66	0,82	3,95
PAEP_9	ss687005957	103299941	5'-flankierend	T>C	T (0,45)	0,66	0,82	3,79
PAEP_10	ss687005958	103300020	5'-flankierend	C>T	C (0,50)	0,57	0,76	4,07
PAEP_11	ss687005959	103300067	5'-flankierend	T>C	T (0,47)	0,53	0,78	5,47
PAEP_12	ss687005960	103300078	5'-flankierend	T>G	T (0,47)	0,53	0,78	5,21
PAEP_13	ss687005961	103300131	5'-flankierend	G>A	A (0,17)	0,07	0,16	6,09
PAEP_14	ss687005962	103300244	5'-flankierend	G>A	G (0,43)	0,59	0,81	5,47
PAEP_15	ss687005963	103300324	5'-flankierend	G>A	G (0,44)	0,54	0,77	5,86
PAEP_16	ss687005964	103300548	5'-flankierend	A>G	A (0,42)	0,63	0,86	4,33
PAEP_17	ss687005965	103300608	5'-flankierend	A>C	A (0,41)	0,69	0,91	3,12
PAEP_18	ss687005966	103300672	Promotor	C>G	C (0,42)	0,72	0,95	3,07
PAEP_19	ss687005967	103300697	Promotor	C>A	C (0,49)	0,69	0,79	2,63
PAEP_20	ss687005969	103300719	Promotor	G>A	A (0,49)	0,61	0,72	2,74
PAEP_21	ss687005970	103300725	Promotor	C>G	G (0,48)	0,57	0,69	3,09
PAEP_22	ss687005971	103300899	Promotor	A>G	A (0,43)	0,67	0,91	5,60
PAEP_23	ss687005972	103300973	Promotor	G>A	A (0,28)	0,39	0,29	5,40
PAEP_24	ss687005973	103301002	Promotor	G>C	G (0,45)	0,66	0,82	5,21
PAEP_25	ss687005974	103301030	Promotor	C>T	C (0,45)	0,57	0,82	5,30
PAEP_26	ss687005975	103301063	Promotor	A>C	A (0,43)	0,67	0,91	5,37
PAEP_27	ss687005976	103301202	Promotor	C>G	C (0,47)	0,61	0,87	5,51
PAEP_28	ss687005977	103301229	Promotor	C>G	C (0,45)	0,66	0,91	5,19
PAEP_29	ss687005978	103301242	Promotor	G>A	A (0,19)	0,08	0,14	4,79
PAEP_30	ss687005979	103301297	Promotor	T>C	T (0,45)	0,66	0,91	4,93
PAEP_31	ss687005980	103301443	Promotor	C>T	C (0,43)	0,59	0,82	3,77
PAEP_32	ss687005981	103301455	Promotor	G>C	G (0,43)	0,59	0,82	4,00
PAEP_33	ss687005982	103301561	Promotor	G>C	G (0,42)	0,72	0,95	3,16
PAEP_34	ss687005983	103301648	Promotor	A>G	G (0,00)	-	-	2,37
PAEP_35	ss687005984	103301690	5'-UTR	C>T	C (0,48)	0,57	0,83	3,12
PAEP_36	ss687005985	103301694	5'-UTR	A>G	A (0,48)	0,57	0,83	3,40
PAEP_37	ss687005986	103301736	Exon 1	T>C (T11)	T (0,44)	0,70	0,95	4,09
PAEP_38	ss687005987	103301757	Exon 1	T>C (I18)	T (0,43)	0,76	1,00	3,63
PAEP_39	ss687005988	103301805	Intron 1	C>G	C (0,43)	0,76	1,00	3,72
PAEP_40	ss687005989	103301982	Intron 1	G>A	G (0,43)	0,76	1,00	4,02
PAEP_41	ss687005990	103302129	Intron 1	A>G	A (0,42)	0,72	0,95	5,14
PAEP_42	ss687005991	103302219	Intron 1	A>G	A (0,22)	0,28	0,38	5,47

Tabelle 9.12: SNP des PAEP-Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA11)	Region	Allele	MAF	LD (als $r^2$ ) mit ARS-BFGL-NGS-31097	LD (als $r^2$ ) mit PAEP_45	Abdeckung
PAEP_43	ss687005992	103302272	Intron 1	T>C	T (0,42)	0,72	0,95	5,77
PAEP_44	ss687005993	103302281	Intron 1	G>A	A (0,01)	0,00	0,01	5,40
PAEP_45	ss687005994	103302351	Intron 1	C>T	C (0,43)	0,76	-	4,67
PAEP_46	ss687005995	103302429	Intron 1	C>G	C (0,44)	0,70	0,95	4,09
PAEP_47	ss687005996	103302553	Exon 2	G>C (E61Q)	C (0,02)	0,02	0,02	4,49
PAEP_48	ss687005997	103302608	Intron 2	C>T	T (0,02)	0,02	0,02	3,81
PAEP_49	ss687005998	103302617	Intron 2	A>C	C (0,15)	0,06	0,13	2,05
PAEP_50		103302619	Intron 2	A>C	C (0,15)	0,10	0,13	3,84
PAEP_51		103302766	Intron 2	C>T	C (0,42)	0,72	0,95	5,67
PAEP_52	ss687006000	103302780	Intron 2	C>T	T (0,02)	0,02	0,02	5,86
PAEP_53	ss687006001	103303242	Intron 2	A>G	A (0,47)	0,78	0,78	4,26
PAEP_54	ss687006002	103303327	Intron 2	A>G	A (0,47)	0,70	0,78	2,91
PAEP_55	ss687006003	103303343	Intron 2	C>T	C (0,45)	0,58	0,65	2,44
PAEP_56	ss687006004	103303473	Exon 3	C>T (N79)	C (0,48)	0,65	0,65	4,26
PAEP_57	ss687006005	103303475	Exon 3	G>A (G80D)	G (0,48)	0,65	0,65	4,16
PAEP_58	ss687006006	103303619	Intron 3	G>A	A (0,50)	0,65	0,67	3,88
PAEP_59	ss687006007	103303620	Intron 3	G>A	A (0,50)	0,65	0,67	3,77
PAEP_60	ss687006008	103303662	Intron 3	C>T	T (0,12)	0,13	0,10	2,58
PAEP_61	ss687006009	103303700	Intron 3	T>C	C (0,49)	0,61	0,72	2,95
PAEP_62	ss687006010	103303701	Intron 3	G>A	A (0,49)	0,61	0,72	3,02
PAEP_63	ss687006011	103303792	Intron 3	C>T	C (0,44)	0,71	0,77	3,56
PAEP_64	ss687006013	103303895	Intron 3	C>A	A (0,19)	0,14	0,17	3,49
PAEP_65	ss687006014	103304052	Intron 3	T>C	T (0,21)	0,18	0,26	3,95
PAEP_66	ss687006015	103304094	Intron 3	G>A	A (0,49)	0,61	0,72	3,86
PAEP_67	ss687006016	103304129	Intron 3	C>T	T (0,27)	0,16	0,18	3,21
PAEP_68	ss687006017	103304197	Intron 3	A>G	A (0,43)	0,51	0,64	2,42
PAEP_69	ss687006018	103304235	Intron 3	C>T	C (0,44)	0,47	0,60	3,07
PAEP_70	ss687006019	103304236	Intron 3	G>T	T (0,27)	0,17	0,18	3,14
PAEP_71	ss687006020	103304468	Intron 3	A>G	G (0,49)	0,61	0,64	3,30
PAEP_72	ss687006021	103304476	Intron 3	G>A	A (0,49)	0,61	0,64	3,26
PAEP_73	ss687006022	103304509	Intron 3	T>C	C (0,49)	0,61	0,64	3,21
PAEP_74	ss687006023	103304510	Intron 3	G>A	A (0,49)	0,61	0,64	3,09
PAEP_75	ss687006024	103304593	Intron 3	C>T	T (0,44)	0,62	0,77	2,95
PAEP_76	ss687006025	103304617	Intron 3	C>G	G (0,01)	0,00	0,02	3,44
PAEP_77	ss687006026	103304643	Intron 3	T>C	C (0,42)	0,63	0,77	3,81
PAEP_78	ss687006027	103304656	Intron 3	A>T	T (0,42)	0,63	0,77	3,58
PAEP_79	ss687006028	103304668	Exon 4	C>T (N104)	T (0,42)	0,63	0,77	3,91
PAEP_80	ss687006029	103304757	Exon 4	T>C (V134A)	C (0,44)	0,70	0,77	3,72
PAEP_81	ss687006030	103304870	Intron 4	A>G	G (0,04)	0,04	0,05	2,56
PAEP_82	ss687006031	103304944	Intron 4	T>C	C (0,45)	0,74	0,82	3,65
PAEP_83	ss687006032	103305230	Intron 4	G>T	G (0,45)	0,74	0,82	3,47
PAEP_84	ss687006033	103305451	Exon 5	G>A (R140)	A (0,02)	0,02	0,03	4,02

Tabelle 9.12: SNP des PAEP-Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA11)	Region	Allele	MAF	LD (als $r^2$ ) mit ARS-BFGL-NGS-31097	LD (als $r^2$ ) mit PAEP_45	Abdeckung
PAEP_85	ss687006034	103305742	Intron 5	G>A	G (0,45)	0,74	0,82	1,30
PAEP_86	ss687006035	103305744	Intron 5	T>C	T (0,44)	0,71	0,86	1,37
PAEP_87	ss687006036	103305866	Intron 6	T>A	A (0,01)	0,01	0,02	3,00
PAEP_88	ss687006037	103306006	Intron 6	C>T	T (0,06)	0,06	0,08	4,86
PAEP_89		103306121	Intron 6	G>A	A (0,04)	0,04	0,03	3,84
PAEP_90	ss687006038	103306167	Intron 6	A>G	A (0,47)	0,61	0,78	3,09
PAEP_91		103306343	3'-UTR	G>C	C (0,08)	0,09	0,07	4,58
PAEP_92		103306348	3'-UTR	C>T	T (0,08)	0,09	0,07	4,63
PAEP_93	ss687006039	103306372	3'-UTR	A>G	G (0,08)	0,09	0,07	4,88
PAEP_94	ss687006040	103306485	3'-flankierend	C>T	T (0,01)	0,00	0,02	4,51
PAEP_95	ss687006041	103306804	3'-flankierend	A>G	G (0,02)	0,02	0,02	6,70
PAEP_96	ss687006042	103306820	3'-flankierend	G>A	A (0,21)	0,27	0,35	7,12
PAEP_97	ss687006043	103307072	3'-flankierend	C>A	A (0,02)	0,02	0,02	7,44
PAEP_98	ss687006044	103307124	3'-flankierend	G>A	A (0,43)	0,59	0,81	6,07
PAEP_99	ss687006045	103307330	3'-flankierend	G>A	A (0,47)	0,70	0,78	5,88
PAEP_100		103307596	3'-flankierend	A>T	T (0,44)	0,71	0,86	5,12
PAEP_101	ss687006047	103307635	3'-flankierend	G>A	A (0,14)	0,02	0,12	5,30
PAEP_102	ss687006048	103307682	3'-flankierend	C>T	T (0,16)	0,05	0,15	5,26
PAEP_103	ss687006049	103307754	3'-flankierend	C>T	T (0,06)	0,06	0,08	4,91
PAEP_104	ss687006050	103307824	3'-flankierend	A>G	A (0,05)	0,05	0,04	3,81
PAEP_105	ss687006051	103308050	3'-flankierend	C>T	T (0,15)	0,18	0,24	5,28

## 9 Anhang

Table 9.13: SNP des DGAT1-Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA14)	Region	Allele	MAF	LD (als $r^2$ ) mit BovineHD- 1400000216	Abdeckung
DGAT1_1	ss688297225	1.793.616	5'-flankierend	T>C	C (0,07)	0,19	4,53
DGAT1_2	ss688297226	1.795.176	5'-flankierend	C>G	G (0,16)	0,00	4,02
DGAT1_3	ss688297227	1.795.536	Exon1	G>C (E33D)	C (0,02)	0,00	1,84
DGAT1_4	ss688297228	1.796.111	Intron1	A>G	G (0,01)	0,00	4,91
DGAT1_5	ss688297229	1.796.252	Intron1	C>T	T (0,01)	0,00	5,02
DGAT1_6	ss688297230	1.797.575	Intron1	G>T	T (0,01)	0,00	4,91
DGAT1_7		1.798.948	Intron1	G>T	T (0,02)	0,15	3,42
DGAT1_8	ss688297231	1.799.066	Intron1	A>G	G (0,09)	0,35	3,63
DGAT1_9		1.799.151	Intron1	C>G	G (0,01)	0,00	2,16
DGAT1_10		1.799.456	Intron2	T>G	G (0,05)	0,06	2,21
DGAT1_11	ss688297232	1.799.476	Intron2	T>C	C (0,14)	0,22	3,77
DGAT1_12	ss688297233	1.799.567	Intron2	T>C	C (0,04)	0,09	4,47
DGAT1_13	ss688297234	1.799.707	Intron2	C>T	T (0,04)	0,09	4,14
DGAT1_14	ss688297235	1.800.194	Intron2	C>T	T (0,01)	0,33	3,79
DGAT1_15	ss688297236	1.800.323	Intron2	T>C	C (0,01)	0,33	3,51
DGAT1_16	ss688297237	1.800.399	Intron2	G>A	A (0,09)	0,35	3,40
DGAT1_17	ss688297238	1.800.439	Intron2	A>G	G (0,09)	0,35	3,49
DGAT1_18	ss688297239	1.801.116	Intron2	T>C	C (0,12)	0,28	3,37
DGAT1_19	ss688297240	1.801.222	Intron2	T>G	G (0,02)	0,00	3,53
DGAT1_20	ss688297241	1.802.265	Exon8	GC>AA (K232A)	AA (0,02)	0,66	1,84
DGAT1_21	ss688297243	1.802.779	Intron10	T>G	G (0,16)	0,19	0,21
DGAT1_22	ss688297244	1.804.647	3'-UTR	T>C	C (0,04)	1,00	3,12
DGAT1_23	ss688297245	1.805.579	3'-flankierend	G>A	A (0,02)	0,15	4,35
DGAT1_24		1.805.793	3'-flankierend	T>G	G (0,07)	0,19	1,40
DGAT1_25	ss688297246	1.805.963	3'-flankierend	G>C	C (0,08)	0,41	4,14
DGAT1_26		1.806.340	3'-flankierend	C>A	A (0,02)	0,15	2,51

Tabelle 9.14: SNP des *GPIHBP1*-Gens aus der Resequenzierung des HF-Tierpanels.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA14)	Region	Allele	MAF	LD (als $r^2$ ) mit Hapmap30086-BTC-002066
4123	ss688299535	2553998	5'-flankierend	G>A	G (0,38)	0,60
4124	ss688299534	2553653	5'-flankierend	C>A	C (0,42)	0,43
4125	ss688299532	2553525	5'-flankierend	G>A	G (0,42)	0,43
4126		2553065	5'-flankierend	G>A	A (0,04)	0,04
4127		2552701	Promotor	C>T	T (0,04)	0,04
4128	ss688299529	2552574	5'-UTR	A>G	A (0,38)	0,60
4129	ss688299528	2551922	Intron1	G>C	G (0,42)	0,43
4130		2551540	Exon2	C>T (D28)	T (0,04)	0,04
4131		2550904	Intron2	C>T	T (0,04)	0,00
4132	ss688299527	2550469	Exon4	C>T (G145)	C (0,42)	0,43
4133		2550370	3'-flankierend	C>T	T (0,04)	0,04
4134		2550326	3'-flankierend	G>T	T (0,25)	0,33
4135	ss688299526	2550228	3'-flankierend	G>A	A (0,29)	0,41
4136	ss688299525	2550192	3'-flankierend	CCTGT>T	T (0,29)	0,41
4137	ss688299524	2550078	3'-flankierend	T>C	T (0,42)	0,43
4138		2549445	3'-flankierend	C>T	T (0,04)	0,04

## 9 Anhang

Tabelle 9.15: SNP des FASN-Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA19)	Region	Allele	MAF	LD (als $r^2$ ) mit ARS-BFGL- NGS-39328	Abdeckung
FASN_1	ss700026493	51.383.847	5'-flankierend	C>G	G (0,26)	0,18	4,47
FASN_2	ss700026494	51.384.984	5'-UTR	C>G	C (0,37)	0,76	1,77
FASN_3	ss700026496	51.386.069	Intron 1	G>A	A (0,01)	0,01	4,74
FASN_4	ss700026498	51.386.135	Intron 1	G>A	A (0,01)	0,02	4,67
FASN_5	ss700026500	51.386.344	Intron 1	A>G	G (0,27)	0,19	4,95
FASN_6	ss700026501	51.386.735	Intron 1	C>T	T (0,36)	0,13	5,51
FASN_7	ss700026503	51.387.140	Intron 2	C>G	G (0,14)	0,08	4,81
FASN_8	ss700026505	51.387.607	Intron 2	C>G	C (0,33)	0,95	3,91
FASN_9	ss700026506	51.388.187	Intron 3	G>A	A (0,14)	0,08	5,65
FASN_10	ss700026508	51.388.204	Intron 3	C>T	T (0,33)	0,85	5,23
FASN_11	ss700026510	51.388.333	Intron 3	A>G	A (0,34)	0,26	5,63
FASN_12	ss700026512	51.388.582	Intron 3	G>A	A (0,14)	0,02	2,95
FASN_13	ss700026513	51.388.790	Intron 3	A>G	G (0,16)	0,10	3,60
FASN_14	ss700026515	51.388.923	Intron 3	G>C	G (0,24)	0,64	3,60
FASN_15	ss700026517	51.388.961	Intron 3	C>T	T (0,31)	0,03	3,37
FASN_16	ss700026519	51.389.106	Intron 3	A>T	T (0,33)	0,02	4,81
FASN_17	ss700026520	51.389.943	Intron 5	C>T	T (0,04)	0,02	3,67
FASN_18	ss700026522	51.389.983	Intron 5	G>T	T (0,01)	0,02	4,35
FASN_19	ss700026524	51.390.138	Intron 6	C>T	T (0,02)	0,01	2,86
FASN_20	ss700026526	51.391.030	Intron 8	G>C	C (0,19)	0,12	5,33
FASN_21	ss700026527	51.391.057	Intron 8	C>T	T (0,19)	0,12	4,72
FASN_22	ss700026529	51.391.830	Exon 10	C>T (S509)	T (0,43)	0,13	3,84
FASN_23	ss700026531	51.392.422	Intron 11	G>A	A (0,01)	0,02	4,51
FASN_24	ss700026533	51.392.541	Intron 11	C>A	C (0,43)	0,04	4,19
FASN_25	ss700026534	51.392.698	Intron 11	G>A	A (0,01)	0,02	4,58
FASN_26	ss700026536	51.393.068	Intron 12	C>T	T (0,43)	0,15	2,19
FASN_27	ss700026538	51.393.778	Intron 15	C>T	T (0,05)	0,03	3,00
FASN_28	ss700026540	51.394.254	Intron 16	G>A	A (0,07)	0,00	3,98
FASN_29	ss700026541	51.394.689	Intron 18	C>T	T (0,27)	0,19	4,91
FASN_30	ss700026543	51.395.194	Exon 20	C>G (I1056M)	G (0,06)	0,03	4,77
FASN_31	ss700026545	51.395.400	Exon 21	G>A (S1099)	A (0,28)	0,20	4,07
FASN_32	ss700026547	51.395.439	Exon 21	A>G (E1112)	G (0,00)	-	4,74
FASN_33	ss700026548	51.395.478	Exon 21	G>A (P1125)	A (0,08)	0,05	4,77
FASN_34	ss700026550	51.395.532	Exon 21	G>A (Q1143)	A (0,28)	0,20	4,09
FASN_35	ss700026552	51.395.652	Intron 21	C>T	T (0,49)	0,00	4,58
FASN_36	ss700026554	51.395.684	Intron 21	G>A	A (0,23)	0,06	4,49
FASN_37	ss700026555	51.395.766	Intron 21	G>A	A (0,22)	0,14	4,26
FASN_38	ss700026557	51.395.812	Intron 21	G>A	A (0,22)	0,10	4,02
FASN_39	ss700026559	51.396.588	Intron 22	G>A	A (0,06)	0,00	0,35
FASN_40	ss700026561	51.396.995	Exon 23	C>T (G1332)	C (0,49)	0,00	3,00
FASN_41	ss700026562	51.397.150	Intron 23	T>G	G (0,05)	0,01	2,86
FASN_42	ss700026564	51.397.250	Exon 24	T>C (Y1390H)	T (0,48)	0,02	3,35
FASN_43	ss700026566	51.398.083	Exon 27	T>C (S1551)	T (0,23)	0,06	4,84
FASN_44	ss700026567	51.398.557	Intron 28	T>C	T (0,23)	0,13	3,51
FASN_45	ss700026569	51.398.824	Intron 29	A>G	A (0,47)	0,02	5,28
FASN_46	ss700026571	51.399.648	Exon 32	C>A (L1856I)	C (0,48)	0,01	4,56
FASN_47	ss700026573	51.399.720	Intron 32	G>A	A (0,48)	0,00	4,30
FASN_48	ss700026574	51.400.139	Exon 34	G>A (A1950T)	A (0,47)	0,18	5,05
FASN_49	ss700026576	51.400.154	Exon 34	C>T (R1955W)	T (0,26)	0,18	4,95
FASN_50	ss700026578	51.400.463	Intron 35	C>T	T (0,26)	0,04	5,00
FASN_51	ss700026580	51.401.022	Exon 37	C>T (L2113)	C (0,24)	0,09	4,42
FASN_52	ss700026583	51.402.032	Exon 39	G>A (A2264T)	A (0,23)	0,06	4,53
FASN_53	ss700026585	51.402.431	Intron 40	T>C	C (0,02)	0,05	1,56
FASN_54	ss700026587	51.402.771	Exon 42	C>T (F2425)	T (0,04)	0,07	2,60
FASN_55	ss700026588	51.402.774	Exon 42	C>T (Y2426)	T (0,31)	0,10	2,60
FASN_56	ss700026590	51.402.838	Exon 42	C>T (L2448)	T (0,01)	0,02	2,77
FASN_57	ss700026592	51.403.259	3'-UTR	C>T	T (0,02)	0,05	3,02
FASN_58	ss700026594	51.404.194	3'-flankierend	G>A	A (0,13)	0,08	7,02
FASN_59	ss700026595	51.404.308	3'-flankierend	G>A	A (0,01)	0,01	5,88
FASN_60	ss700026597	51.404.963	3'-flankierend	A>C	A (0,47)	0,01	7,05
FASN_61	ss700026599	51.405.047	3'-flankierend	C>T	T (0,04)	0,00	6,77

Tabelle 9.16: SNP des GHR-Gens aus der Next-Generation-Sequenzierung der FV-Gründertiere.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA20)	Region	Alleles	MAF	LD (als $r^2$ ) mit BovineHD2000009150	Abdeckung
GHR_1	ss700602479	32.065.846	5'-flankierend	T>C	C (0,15)	0,14	6,60
GHR_2	ss700602477	32.065.580	5'-flankierend	C>G	G (0,41)	0,15	5,79
GHR_3	ss700602475	32.065.522	5'-flankierend	C>A	A (0,49)	0,05	6,95
GHR_4	ss700602474	32.065.205	5'-flankierend	G>C	C (0,49)	0,05	6,93
GHR_5	ss700602472	32.064.279	5'-flankierend	G>A	A (0,49)	0,05	7,21
GHR_6	ss700601700	31.933.017	Intron3	G>C	C (0,43)	0,17	7,60
GHR_7	ss700601470	31.909.478	Exon7	A>T (F279Y)	T (0,06)	0,19	7,37
GHR_8	ss700601468	31.909.419	Intron7	A>G	G (0,04)	0,01	7,26
GHR_9	ss700601447	31.902.571	Intron7	C>A	C (0,11)	0,36	5,86
GHR_10	ss700601445	31.902.448	Intron8	C>T	C (0,50)	0,10	4,95
GHR_11	ss700601352	31.891.788	Intron8	T>C	C (0,50)	0,24	5,60
GHR_12	ss700601350	31.891.618	Exon9	G>A (D365)	A (0,34)	0,16	6,33
GHR_13	ss700601348	31.891.447	Exon9	A>G (L422)	G (0,01)	0,04	8,42
GHR_14	ss700601346	31.891.231	Exon9	A>G (N494)	G (0,02)	0,00	6,72
GHR_15	ss700601345	31.891.177	Exon9	C>T (T512)	T (0,04)	0,01	5,42
GHR_16	ss700601343	31.891.130	Exon9	T>G (N528T)	T (0,28)	0,62	7,09
GHR_17	ss700601341	31.891.107	Exon9	C>T (A536T)	T (0,02)	0,00	6,58
GHR_18	ss700601340	31.891.078	Exon9	A>G (H545)	A (0,24)	0,76	6,84
GHR_19	ss700601338	31.891.050	Exon9	T>C (S555G)	C (0,40)	0,13	7,02
GHR_20	ss700601336	31.891.025	Exon9	G>A (T563I)	G (0,00)	-	7,19
GHR_21	ss700601334	31.890.904	Exon9	G>A (L603)	A (0,30)	0,14	6,42
GHR_22	ss700601333	31.890.791	3'-UTR	A>G	A (0,28)	0,72	5,98
GHR_23	ss700601331	31.890.704	3'-flankierend	A>G	G (0,19)	0,07	4,37
GHR_24	ss700601327	31.890.610	3'-flankierend	C>G	C (0,26)	0,71	4,72
GHR_25	ss700601325	31.890.552	3'-flankierend	T>C	C (0,04)	0,02	2,60
GHR_26	ss700601316	31.890.499	3'-flankierend	A>G	G (0,16)	0,06	4,84
GHR_27	ss700601315	31.890.237	3'-flankierend	G>A	A (0,01)	0,04	6,51
GHR_28	ss700601311	31.889.893	3'-flankierend	T>C	T (0,24)	0,88	7,02
GHR_29	ss700601310	31.889.823	3'-flankierend	C>T	T (0,02)	0,00	6,93
GHR_30	ss700601308	31.889.784	3'-flankierend	C>T	T (0,19)	0,07	7,09
GHR_31	ss700601306	31.889.781	3'-flankierend	T>C	T (0,45)	0,30	7,02
GHR_32	ss700601304	31.889.774	3'-flankierend	C>T	T (0,05)	0,00	7,00
GHR_33	ss700601299	31.889.596	3'-flankierend	G>T	G (0,24)	0,76	5,72
GHR_34	ss700601297	31.889.595	3'-flankierend	G>T	G (0,24)	0,76	5,79
GHR_35	ss700601295	31.889.529	3'-flankierend	A>G	A (0,23)	0,82	6,63
GHR_36	ss700601293	31.889.478	3'-flankierend	T>C	T (0,23)	0,82	6,33
GHR_37	ss700601292	31.889.439	3'-flankierend	C>T	T (0,19)	0,07	6,09
GHR_38	ss700601290	31.889.047	3'-flankierend	G>A	G (0,43)	0,25	6,28

Tabelle 9.17: SNP des GPAT4-Gens aus der Resequenzierung des HF-Tierpanels und aus der NGS der FV-Gründertiere.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA27)	Region	Allele	MAF HF	LD (als r <sup>2</sup> ) mit ARS-BFGL-NGS-57448	MAF FV	LD (als r <sup>2</sup> ) mit BovineHD2700010364	Abdeckung
3969	ss410758869	36.210.469	Promotor	A>G	G (0,25)	0,24	G (0,40)	0,00	7,5
3970	ss410758870	36.210.861	Promotor	G>A	A (0,04)	0,03			
3971	ss410758871	36.210.887	Promotor	G>C	C (0,04)	0,03	C (0,12)	0,08	8,6
3972	ss410758872	36.211.037	Promotor	G>A	A (0,25)	0,24			
3973	ss410758873	36.211.222	Promotor	G>A	A (0,25)	0,24	A (0,49)	0,00	5,1
3974	ss410759404	36.211.257	Promotor	GA>T	T (0,42)	1,00	T (0,21)	0,25	4,8
3975	ss410758875	36.211.708	Promotor	C>T	T (0,50)	1,00	T (0,28)	0,29	5,3
3976	ss410758876	36.211.937	5'-UTR	G>T	T (0,08)	0,07			
3977	ss410758877	36.212.352	5'-UTR	A>G	G (0,42)	1,00	G (0,28)	0,28	4,0
3978	ss410758878	36.212.557	5'-UTR	T>C	T (0,21)	0,19	T (0,19)	0,14	4,6
3979	ss410758879	36.212.706	Exon 2	C>T (T24)	T (0,04)	0,03	T (0,11)	0,07	4,3
3980	ss410758880	36.220.692	Exon 4	T>C (D114)	T (0,17)	0,14	T (0,22)	0,18	5,5
3981	ss410758881	36.220.979	Intron 4	C>T	C (0,17)	0,14	C (0,21)	0,17	4,3
3982	ss410758882	36.221.333	Intron 4	G>T	T (0,42)	1,00	T (0,29)	0,18	4,0
3983	ss410758883	36.222.391	Intron 5	G>A	A (0,08)	0,07			
3984	ss410758884	36.223.308	Intron 7	G>A	A (0,25)	0,24	A (0,43)	0,01	5,9
3985	ss410758885	36.223.495	Intron 8	C>T	T (0,25)	0,24	T (0,43)	0,01	5,4
3986	ss410758886	36.224.545	Intron 9	G>C	C (0,46)	0,84	C (0,27)	0,33	5,0
3987	ss410758887	36.224.945	Intron 10	G>C	A (0,25)	0,24	A (0,43)	0,01	4,7
3988	ss410758888	36.227.882	Intron 10	G>A	A (0,04)	0,03	A (0,11)	0,07	6,7
3989	ss410758889	36.228.046	Intron 11	C>T	T (0,04)	0,03	T (0,09)	0,06	4,9
3990	ss410758890	36.228.262	Intron 12	A>G	A (0,17)	0,14	A (0,20)	0,15	2,7
3991	ss410758891	36.228.340	Intron 12	T>G	G (0,08)	0,07			
3992	ss410758892	36.228.351	Intron 12	T>C	T (0,21)	0,19	T (0,22)	0,18	3,3
3993	ss410758893	36.228.655	3'-UTR	G>A	A (0,04)	0,03	A (0,05)	0,00	3,3
3994	ss410758894	36.228.939	3'-UTR	G>A	A (0,42)	1,00	A (0,24)	0,35	4,0
3995	ss410758895	36.229.048	3'-flankierend	C>A	A (0,04)	0,03			
3996	ss410758896	36.229.214	3'-flankierend	A>G	G (0,04)	0,03	G (0,11)	0,07	6,1
3997	ss410758897	36.229.303	3'-flankierend	C>T	T (0,04)	0,03			
3998	ss410758898	36.229.461	3'-flankierend	A>G	A (0,17)	0,14	A (0,06)	0,04	3,1

Tabelle 9.18: SNP des GC-Gens aus der Resequenzierung des HF-Tierpanels und aus der NGS der FV-Gründertiere.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA6)	Region	Allele	MAF HF	LD (als r <sup>2</sup> ) mit BTB0165482	MAF FV	LD (als r <sup>2</sup> ) mit BovineHD0600024355	LD (als r <sup>2</sup> ) mit BovineHD0600024354	LD (als r <sup>2</sup> ) mit BovineHD0600024297
4004	ss683327749	88.739.995	Promotor	C>G	-	-	G (0,07)	0,91	0,29	0,29
4005	ss683327748	88.739.941	Promotor	G>T	G (0,46)	0,55	T (0,45)	0,86	0,22	0,32
4006	ss683327747	88.739.458	Promotor	C>T	G (0,21)	0,07	T (0,44)	0,46	0,29	0,29
4007	ss683327746	88.739.444	Promotor	C>T	T (0,04)	0,04	T (0,11)	0,86	0,27	0,21
4008	ss683327745	88.739.413	Promotor	C>T	C (0,21)	0,07	T (0,44)	0,06	0,34	0,57
4009	ss683327744	88.739.365	5'UTR	A>C	-	-	C (0,07)	0,77	0,27	0,29
4010	ss683327743	88.739.195	5'UTR	C>T	T (0,08)	0,09	T (0,29)	0,91	0,22	0,24
4011	ss683327742	88.739.045	Intron 1	T>C	T (0,21)	0,07	C (0,44)	0,09	0,62	0,89
4139	ss683327615	88.722.912	Intron 2	C>T	T (0,08)	0,09	T (0,08)	0,91	0,27	0,89
4140	ss683327614	88.722.903	Intron 2	C>T	G (0,42)	0,71	C (0,24)	0,06	0,26	0,94
4141	ss683327613	88.722.886	Intron 2	G>A	C (0,42)	0,71	G (0,24)	0,32	0,94	0,89
4142	ss683327612	88.722.815	Intron 2	G>T	G (0,42)	0,71	G (0,26)	0,07	0,94	0,77
4143	ss683327611	88.722.797	Intron 2	A>T	A (0,42)	0,71	A (0,24)	0,07	0,17	0,18
4144	ss683327606	88.722.236	Intron 2	A>G	A (0,42)	0,71	A (0,27)	0,13	0,10	0,11
4145	ss683327604	88.722.100	Exon 3	A>G (S54G)	G (0,04)	0,04	-	-	-	-
4146	ss683327604	88.722.065	Exon 3	C>T (N65)	C (0,42)	0,71	C (0,27)	0,07	0,08	0,05
4147	ss683327603	88.721.949	Intron 3	G>A	G (0,42)	0,71	G (0,26)	0,01	0,27	0,29
4148	ss683327590	88.719.786	Exon 4	T>C (D151)	C (0,13)	0,14	C (0,20)	0,07	0,23	0,22
4149	ss683327589	88.719.783	Exon 4	C>T (P152)	C (0,46)	0,15	T (0,20)	0,07	0,27	0,29
4150	ss683327563	88.716.912	Intron 4	C>T	T (0,13)	0,14	T (0,20)	0,76	0,26	0,27
4151	ss683327560	88.716.302	Intron 6	A>G	G (0,04)	0,04	G (0,11)	0,07	0,36	0,34
4152	ss683327559	88.716.262	Intron 6	A>G	G (0,04)	0,04	-	-	-	-
4153	ss683327559	88.716.184	Intron 6	G>T	-	-	T (0,13)	0,01	0,26	0,27
4154	ss683327547	88.716.130	Intron 6	A>G	G (0,04)	0,04	-	-	-	-
4155	ss683327546	88.714.682	Intron 6	A>T	T (0,13)	0,14	T (0,19)	0,22	0,23	0,22
4156	ss683327546	88.714.681	Intron 6	T>G	G (0,13)	0,14	G (0,19)	0,07	0,57	0,62
4157	ss683327545	88.714.676	Intron 6	C>T	T (0,13)	0,14	T (0,19)	0,17	0,26	0,27
4158	ss683327544	88.714.456	Intron 7	A>G	G (0,13)	0,14	G (0,19)	0,10	0,27	0,26
4159	ss683327543	88.714.297	Intron 7	C>T	T (0,08)	0,09	T (0,11)	0,04	0,88	0,94
4160	ss683327523	88.712.662	Exon 8	T>C (D332)	C (0,08)	0,09	C (0,20)	0,27	0,88	0,94
4161	ss683327522	88.712.556	Intron 8	C>G	C (0,04)	0,04	C (0,17)	0,23	0,94	1,00
4162	ss683327521	88.712.502	Intron 8	C>T	T (0,09)	0,10	T (0,09)	0,27	0,12	0,94
4163	ss683327514	88.711.944	Intron 8	A>AAA	I (0,13)	0,14	-	-	-	-
4164	ss683327513	88.711.921	Intron 8	T>A	A (0,13)	0,14	A (0,20)	0,26	0,13	0,71
4165	ss683327512	88.711.884	Exon 9	G>A (R354Q)	A (0,13)	0,14	A (0,20)	0,24	0,02	0,94
4166	ss683327477	88.709.751	Intron 10	A>G	G (0,13)	0,14	G (0,19)	0,26	0,14	0,20
4167	ss683327476	88.709.745	Intron 10	T>C	C (0,17)	0,20	-	-	-	-
4168	ss683327476	88.709.746	Intron 10	T>AATAA	I (0,13)	0,14	-	-	-	-
4169	ss683327475	88.709.732	Intron 10	T>C	C (0,25)	0,33	C (0,14)	0,23	0,21	0,20
4170	ss683327441	88.707.798	Exon 11	T>C (C451)	G (0,09)	0,12	C (0,20)	0,57	0,14	0,36
4171	ss683327440	88.707.708	Intron 11	A>G	C (0,09)	0,12	G (0,19)	0,26	0,20	0,20
4172	ss683327440	88.707.690	Intron 11	T>C	C (0,05)	0,06	-	-	-	-

Tabelle 9.18: SNP des GC-Gens aus der Resequenzierung des HF-Tierpanels und aus der NGS der FV-Gründertiere.

SNP-ID	dbSNP-ID	Position (BTA6)	Region	Allele	MAF HF	LD (als r <sup>2</sup> ) mit BTB0165482	MAF FV	LD (als r <sup>2</sup> ) mit BovineHD0600024355	LD (als r <sup>2</sup> ) mit BovineHD0600024354	LD (als r <sup>2</sup> ) mit BovineHD0600024297
4173	ss683327439	88.707.664	Intron 11	T>C	C (0,05)	0,06	C (0,09)	0,27	0,32	0,02
4174	ss683327438	88.707.658	Intron 11	A>G	G (0,09)	0,12	G (0,19)	0,17	0,20	0,14
4175	ss683327349	88.700.994	3'-flankierend	A>G	G (0,25)	0,33	G (0,17)	0,10	0,21	0,12
4176	ss683327344	88.700.814	3'-flankierend	G>A	A (0,29)	0,41	A (0,16)	0,04	0,57	0,34
4177	ss683327343	88.700.784	3'-flankierend	G>A	A (0,08)	0,09	A (0,20)	0,27	0,20	0,12
4178	ss683327342	88.700.637	3'-flankierend	C>T	T (0,14)	0,16	T (0,20)	0,23	0,24	0,02
4179	ss683327341	88.700.617	3'-flankierend	C>T	T (0,14)	0,16	T (0,20)	0,27	0,66	0,04
4180	ss683327340	88.700.534	3'-flankierend	A>AA	D (0,14)	0,16	-	-	-	-
4181	ss683327339	88.700.355	3'-flankierend	A>G	G (0,14)	0,16	G (0,19)	0,26	0,66	0,20
4182	ss683327338	88.700.293	3'-flankierend	C>A	A (0,14)	0,16	A (0,20)	0,24	0,71	0,36
4183	ss683327337	88.700.199	3'-flankierend	T>A	A (0,14)	0,16	A (0,20)	0,26	0,66	0,03
4184	ss683327336	88.700.197	3'-flankierend	G>T	T (0,14)	0,16	T (0,20)	0,23	0,20	0,03
4185	ss683327335	88.700.172	3'-flankierend	G>A	A (0,14)	0,16	A (0,20)	0,20	0,20	0,20
4186	ss683327294	88.695.755	3'-flankierend	T>C	C (0,04)	0,04	C (0,12)	0,57	0,13	0,04
4187	ss683327293	88.695.689	3'-flankierend	C>T	G (0,05)	0,05	G (0,12)	0,26	0,03	0,06
4188		88.695.547	3'-flankierend	A>C	C (0,23)	0,29	C (0,15)	0,04	0,15	0,15
4189		88.695.545	3'-flankierend	A>C	C (0,23)	0,29	C (0,15)	0,04	0,15	0,15
4190	ss683327290	88.695.512	3'-flankierend	G>A	A (0,05)	0,05	A (0,11)	0,27	0,30	0,01
4191	ss683327289	88.695.492	3'-flankierend	G>A	A (0,05)	0,05	A (0,11)	1,00	0,21	0,03
4192	ss683327287	88.695.224	3'-flankierend	A>G	G (0,05)	0,05	G (0,11)	0,18	0,30	0,04

## Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Fries dafür danken, dass er mir ermöglicht hat an seinem Lehrstuhl dieses Thema zu bearbeiten. Seine Begeisterungsfähigkeit, sein Optimismus und seine Innovationsfreude haben mich stets motiviert.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, da diese Arbeit im Rahmen des Verbundprojektes *MeGA-M* ermöglicht wurde. Des Weiteren möchte ich dem Förderverein Biotechnologieforschung e.V. und allen wissenschaftlichen und industriellen Partnern des *MeGA-M* Projekts für die Zusammenarbeit danken. Mein Dank gilt auch Prof. Georg Thaller von der Christian-Albrechts-Universität Kiel und Herrn Friedrich Reinhardt vom VIT-Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V. für die projektübergreifende Zusammenarbeit mit *GenoTrack*.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Luksch und bei Frau PD Dr. Kühn dafür bedanken, dass sie für das Amt des Vorsitzenden und des zweiten Prüfers zur Verfügung standen.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierzucht möchte ich für die Zusammenarbeit im Labor sowie Birgit Hoffmann für ihre Hilfe bei administrativen Belangen danken. Ich bedanke mich bei meinen Kollegen am Lehrstuhl für Tierzucht für die freundliche Zusammenarbeit und angenehme Atmosphäre. Mein spezieller Dank gilt Dr. Krzyztof Flisikowski für sein offenes Ohr bei Fragen zu Laborangelegenheiten, Dr. Hubert Pausch für seine statistische Expertise und Sandra Jansen für ihre Hilfe bei der Bearbeitung der NGS-Daten sowie für ihr Engagement in unseren gemeinsamen abendlichen Diskussionsrunden. Ganz besonders möchte ich meiner Bürokollegin Simone Jung für die vielen konstruktiven Gespräche unter Biologen danken. Sie hat es stets geschafft mich zu motivieren und ist mir in den Jahren zu einer echten Freundin geworden.

Meinen Teamkollegen und Trainern vom SV Inning und TSV Unterhaching sowie meinen Freunden möchte ich herzlich danken. Dafür, dass sie geduldig zugehört haben, wenn ich über meine Arbeit erzählt habe und dafür, dass sie mir eine wunderschöne Freizeit ermöglicht haben in der ich entspannen und neue Energie tanken konnte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Sofie und Moritz, meinem Bruder Michael sowie Gisela und Dieter. Sie haben an mich geglaubt und mich immer unterstützt. Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Tobias für seine Geduld, Unterstützung und Liebe danken.

# Lebenslauf

---

Name: **Christine Maria Wurmser**

Nationalität: deutsch

Geburtsdatum: 09.11.1981

Geburtsort: Landsberg am Lech

---

## Berufserfahrung

2013 Promotion (Dr. rer. nat.)  
*„Identifizierung und genomische Charakterisierung von Kandidatengenenen für Stoffwechsel- und Gesundheitsmerkmale des Milchrindes“*

02/2008 bis heute Wissenschaftliche Angestellte, Lehrstuhl für Tierzucht (TUM)

03/2012 ADR-Schulung für Beauftragte der Sicherheit bei der Beförderung von Gefahrgut

04/2011 Schulung für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit nach der Gentechniksicherheitsverordnung

10/2007 bis 01/2008 Wissenschaftliche Hilfskraft, Lehrstuhl für Limnologie (TUM)

03/2004 bis 09/2004 Ausbildung zum staatlich geprüften Forschungstaucher

---

## Schulausbildung und Studium

09/2007 Studienabschluss: Diplom-Biologin

10/2006 bis 07/2007 Diplomarbeit, Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung (TUM):  
*„Etablierung der TILLING-Methode und Bestimmung der Mutationsfrequenz einer chemisch mutagenisierten Population im hexaploiden Winterweizen“*

10/2001 bis 10/2006 Studium Biologie (Diplom), Technische Universität München

06/2001 Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife

09/1992 bis 06/2001 Ignaz-Kögler-Gymnasium, Landsberg am Lech

09/1988 bis 07/1992 Grundschule, Penzing

---

---

## Publikationen und Tagungsbeiträge

**Wurmser C**, Pausch H, Fries R (2012): QTL-Analysen für das Merkmal Milchfettgehalt im Laktationsverlauf. Tagungsband der DGfZ/GfT-Gemeinschaftstagung 2012.

Pausch H, **Wurmser C**, Jansen S, Aigner B, Fries R (2012): Imputation of whole-genome sequence information for QTL fine-mapping in the Fleckvieh population. Book of Abstracts of the 33<sup>rd</sup> ISAG conference, Cairns.

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(7):e40711. doi: 10.1371/journal.pone.0040711. Epub 2012 Jul 11.

Krappmann K, **Wurmser C**, Repsilber D, Fries R, Weikard R, Kesting U, Kühn C (2012): Short communication: evaluation of bovine milk residues from routine milk testing programs as DNA source for genotyping. *J Dairy Sci* 95(9):5436-41. doi: 10.3168/jds.2011-5259.

Schwarzenbacher H, Dolezal M, Flisikowski K, Seefried F, **Wurmser C**, Schlötterer C, Fries R (2012): Combining evidence of selection with association analysis increases power to detect regions influencing complex traits in dairy cattle. *BMC Genomics* 30;13:48. doi: 10.1186/1471-2164-13-48.

**Wurmser C**, Eikel I, Buttchereit N, Pausch H, Thaller G, Fries R (2010): Bestimmung des Fettsäuremusters der Milch im Hinblick auf die Stoffwechselbelastung der frühen Laktation bei Holstein-Friesian Kühen. Tagungsband der DGfZ/GfT-Gemeinschaftstagung 2010.

**Wurmser C**, Fries R. (2010): MeGA-M: Die Milchkuh im Gesundheitscheck. Metabolomische und genomische Analysen der Milch für gesunde Milchkühe. *GENOMXPRESS* 1.10: 17-19.

**Wurmser C**, Erbe M, Flisikowski K, Fries R (2009): Einsatz von DNA-Pools auf SNP-Microarrays bei genomweiten Assoziationsstudien. Tagungsband der DGfZ/GfT-Gemeinschaftstagung 2009.

**Wurmser C**, Schwarzenbacher H, Fries R (2008): Haplotypen und Kopplungsungleichgewicht bei Deutschem Braunvieh. Tagungsband der DGfZ/GfT-Gemeinschaftstagung 2008.

---