

**Phänotypische und molekulargenetische Untersuchungen
zur Vererbung von Wackelhörnern beim Fleckvieh**

von Kristin Heidrich

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

**Phänotypische und molekulargenetische Untersuchungen
zur Vererbung von Wackelhörnern beim Fleckvieh**

von
Kristin Heidrich
aus Esslingen am Neckar

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Ivica Medugorac
Arbeitsgruppe Populationsgenomik

Mitbetreuung durch Dr. Sophie Rothammer und Dr. Elisabeth Kunz
Arbeitsgruppe Populationsgenomik

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Ivica Međugorac

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 27. Juli 2018

Meiner Familie

2.2.2	Hornlosigkeit im Deutschen Fleckvieh.....	23
2.2.3	Verzögertes Hornwachstum beim Deutschen Fleckvieh	25
2.3	Kartierung von Genen	25
2.3.1	Genkarten	25
2.3.2	Vom Merkmal zum beeinflussenden Gen.....	26
2.3.3	SNPs (<i>single nucleotide polymorphisms</i>) als genetische Marker	27
2.3.4	Kartierungsmethoden	29
2.3.4.1	Kopplungskartierung.....	29
2.3.4.2	Kopplungsungleichgewichts-Kartierung.....	30
2.3.4.3	Kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopp- lungskartierung	32
3	MATERIAL UND METHODEN	34
3.1	Material	34
3.1.1	Probenmaterial	34
3.1.1.1	Tiere aus bayerischen Fleckviehzuchtbetrieben.....	35
3.1.1.1.1	Probennahme Fleckviehzuchtbetriebe Phase 1	35
3.1.1.1.2	Probennahme Fleckviehzuchtbetriebe Phase 2	36
3.1.1.1.3	Eingesendete Proben.....	36
3.1.1.2	Bullen aus bayerischen Besamungsstationen	37
3.1.1.3	Kühe aus der Versuchsherde der Bayerischen Landes- anstalt für Landwirtschaft in Grub	37
3.1.1.4	Tiere vom Kälbermarkt in Ansbach.....	38
3.1.1.5	Tiere vom Schlachthof in Fürth.....	38

3.1.2	Datenmaterial	39
3.1.2.1	SNP-Genotypen aus Deutschland	39
3.1.2.2	SNP-Genotypen aus der Schweiz	40
3.1.3	Auswahl der Studientiere für die Kartierungen	40
3.1.4	Programme und Datenbanken	44
3.1.5	Geräte	45
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	45
3.1.7	Chemikalien und Reagenzien	46
3.1.8	Puffer	47
3.2	Methoden	48
3.2.1	Erhebung der Phänotypen	48
3.2.2	Probenentnahme	49
3.2.3	Herstellung von Lysat und Extraktion von DNA	49
3.2.3.1	Herstellung von Lysat aus Haar- und Gewebeproben .	49
3.2.3.2	DNA-Gewinnung aus Blut und Haarwurzeln	50
3.2.3.3	DNA-Gewinnung aus Sperma	50
3.2.4	Photometrische Messungen zur Qualität und Quantität der DNA	51
3.2.4.1	Qualität der DNA	51
3.2.4.2	Quantität der DNA	52
3.2.5	Hornlostest	52
3.2.6	Statistische Vergleiche zum Merkmal Wackelhorn	54
3.2.7	Genotypisierung mittels SNP-Chip	54
3.2.8	Qualitätskriterien für SNPs	55
3.2.9	Haplotypisierung	56

3.2.10	Vorbereitung und Durchführung der kombinierten Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungskartierung (<i>cLDLA</i>)	58
3.2.10.1	Korrektur von Verwandtschaftsbeziehungen mithilfe von genomweit vereinheitlichten Verwandtschaftsbeziehungen (<i>unified additive relationships, UARs</i>)	58
3.2.10.2	Erstellung einer Diplotypen-Verwandtschaftsmatrix	59
3.2.10.3	<i>cLDLA</i> mittels Varianzkomponentenanalyse	60
3.2.10.4	Modelle der Kartierungen	61
3.2.10.5	Likelihood Ratio Test	63
3.2.10.6	Signifikanzschwelle der <i>cLDLA</i>	64
3.2.10.7	Auswertung der <i>cLDLA</i>	64
3.2.11	SNP-basierte genomweite Assoziationsstudie (<i>GWAS</i>).....	65
3.2.11.1	Durchführung der <i>GWAS</i>	65
3.2.11.2	Signifikanzschwelle der <i>GWAS</i>	66
3.2.12	Erstellung der Röntgenaufnahmen der Hörner.....	67
4	ERGEBNISSE	68
4.1	Phänotypen heterozygot hornloser Tiere	68
4.1.1	Adulte Wackelhorn-tragende Tiere.....	68
4.1.2	Adulte Wackelhorn-freie Tiere	71
4.1.3	Stirnbeulen bei adulten Kühen	72
4.1.4	Juvenile Wackelhorn-tragende und Wackelhorn-freie Tiere .	73
4.1.5	Tiere mit Phänokopien	74
4.1.6	Wackelhorn-freie Bullen aus Linien mit verzögertem Hornwachstum	75

4.2	Ergebnisse der kombinierten Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungskartierungen (<i>cLDLAs</i>)	77
4.2.1	<i>cLDLAs</i> von Tierset 1	77
4.2.2	<i>cLDLAs</i> von Tierset 2	80
4.2.3	<i>cLDLAs</i> von Tierset 3	82
4.3	Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalysen (<i>GWAS</i>)	83
4.4	Ergebnisse der Pneumatisationsstudie	85
5	DISKUSSION	90
5.1	Der Weg zum gewählten Tierset	90
5.2	Die Wahl von Methode und Modell	93
5.3	Schwierigkeiten und Chancen durch Phänokopien	94
5.4	Kartierungsstudien zu Wackelhörnern	96
5.5	Hypothese zur Genetik von Wackelhörnern im Fleckvieh	99
5.6	Ausblick.....	101
6	ZUSAMMENFASSUNG	103
7	SUMMARY	106
8	LITERATURVERZEICHNIS	109
9	ANHANG	120
10	DANKSAGUNG	121

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BTA	Rinderchromosom
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cLDLA	kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsanalyse
cm	Centimeter
cM	Centimorgan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
DRM	diplotype relationship matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
et al.	et alii/aliae
e.V.	eingetragener Verein
FOXC2	forkhead box C2
FOXL2	forkhead box L2
G _{RM}	additive genetic relationship matrix
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
GZW	Gesamtzuchtwert
H	Horn
HMM	Hidden Markov Model
IBD	Identity by descent, Herkunftsgleichheit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LOC	Locus

LocIBD	Locus-IBD
LRT	likelihood ratio test statistic
kb	Kilobase(n)
KB	künstliche Besamung
M	molare Masse
MAF	minor allele frequency
Mb	Megabasen
mg	Miligramm
ml	Mililiter
µl	Mikroliter
N	Grundgesamtheit
OD	optische Dichte
OLIG2	oligodendrocyte transcription factor 2
P	Hornloslocus/ Hornlosallel/ Phänotyp hornlos
P _C	keltisches Hornlosallel
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _F	friesisches Hornlosallel
PMS	Hornlosigkeits-Multisystemsindrom
pp	gehört
Pp	heterozygot hornlos
PP	homozygot hornlos
Prof.	Professor
PS	heterozygot hornlos mit Wackelhornausprägung
QTL	quantitative trait locus/loci
RNA	Ribonukleinsäure
RXFP2	relaxin family peptide receptor 2
s.	siehe

Sc	Wackelhornlocus/Wackelhornallel
SNP	single nucleotide polymorphism
T2SS	Bovines Wackelhornsyndrom Typ 2
Tab.	Tabelle
TWIST1	twist family bHLH transcription factor 1
TWIST2	twist family bHLH transcription factor 2
UAR	unified additive relationships
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolettstrahlung
v. Chr.	vor Christus
z. B.	zum Beispiel
ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung eines Längs- und Querschnitts durch das Horn einer adulten Kuh	6
Abbildung 2:	Vorkommen von keltischer und friesischer Hornlosmutation in mehr als 50 europäischen Rinderrassen.....	12
Abbildung 3:	Nahaufnahmen der Wimpern hornloser Tiere.....	13
Abbildung 4:	Formen von Wackelhörnern beim Fleckvieh	15
Abbildung 5:	Große Stirnbeulen einer Fleckviehkuh (ausgeschoren). 16	
Abbildung 6:	Bovines Wackelhornsyndrom Typ 2 (T2SS).....	21
Abbildung 7:	Fleckviehbulle Ralmesbach PS	23
Abbildung 8:	Verhältnis Wackelhorn-tragender zu Wackelhorn-freien Pp Tieren in Bullen und Kühen	68
Abbildung 9:	Pp Fleckviehbulle mit Vertiefung an der Hornansatzstelle (ausrasiert)	72
Abbildung 10:	Hornstatus in der Familie des Bulle X.....	76
Abbildung 11:	Ergebnisse der <i>cLDLAs</i> von Tierset 1	78
Abbildung 12:	Ergebnisse der <i>cLDLAs</i> von Tierset 2	80
Abbildung 13:	Ergebnisse der <i>cLDLAs</i> von Tierset 3	82
Abbildung 14:	Ergebnisse der <i>GWAS</i>	84
Abbildung 15:	Röntgenaufnahmen: Hornpaare von Kühen der Altersgruppe > 1,5–2 Jahre	86
Abbildung 16:	Röntgenaufnahmen: Hornpaare von Bullen der Altersgruppe > 2–2,5 Jahren	87
Abbildung 17:	Röntgenaufnahme: Asymmetrisch verlaufende Pneumatisation der Hörner	88

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Hornloskürzel beim Doppelnutzungs-Fleckvieh	25
Tabelle 2:	Probenmaterial zur Pneumatisation von Fleckviehhörnern .	39
Tabelle 3:	Proben- und Datenmaterial für die Kartierungsstudie	43
Tabelle 4:	Programme und Datenbanken	44
Tabelle 5:	Geräte	45
Tabelle 6:	Verbrauchsmaterialien	46
Tabelle 7:	Chemikalien und Reagenzien	46
Tabelle 8:	Zuordnung von Phänotypen und Ziffern in Modell K und D.	62
Tabelle 9:	Verteilung auf die Phänotypgruppen in Modell D	62
Tabelle 10:	Verteilung auf die Phänotypgruppen in Modell K	63
Tabelle 11:	Verteilung der Wackelhorngröße bei Bullen und Kühen.....	69
Tabelle 12:	Wackelhorngröße bei Bullen im Alter von 4,1–4,4 Jahren ..	70
Tabelle 13:	Auswertbarkeit der Kartierungsmodelle	77
Tabelle 14:	<i>LRT</i> -Maxima des Tiersets 1	79
Tabelle 15:	<i>LRT</i> -Maxima des Tiersets 2	81
Tabelle 16:	<i>GWAS</i> -Maxima von Tierset 1	83
Tabelle 17:	Anzahl der Tiere ohne Pneumatisation der Hörner	89

ANHANG

Anhang 1:	Fragebogen zur Erhebung des Hornstatus bei Fleckvieh- Tieren.....	120
------------------	--	-----

1 EINLEITUNG

Die Hornloszucht beim Deutschen Fleckvieh hat bereits vor über 40 Jahren begonnen. Mittlerweile findet sich in der Fleischlinie dieser Rasse kaum mehr ein gehörntes Tier. Bei Tieren der Doppelnutzung hat die Zucht auf Hornlosigkeit dagegen erst in den letzten Jahren entscheidende Bedeutung erlangt (GÖTZ et al., 2015).

Die Hornlosigkeit bringt eine Reihe wirkungsvoller Vorteile mit sich. Sie trägt dazu bei, dass Verletzungen von Mensch und Tier durch Hornstöße vermieden werden können und sorgt so für mehr Arbeitssicherheit und Tiergesundheit. Hornlose Rinder zeigen weiterhin ein ruhigeres Verhalten in der Gruppe und können auch besser transportiert werden. Durch genetisch hornlose Rinder entfällt außerdem die häufig routinemäßig durchgeführte Enthornungspraxis im Kalbesalter. Der beachtliche Wert, der dabei für den Tierschutz entsteht, wird noch ergänzt durch wirtschaftliche Vorteile für den Landwirt. Muss keine Enthornung durchgeführt werden, spart dies Zeit und Kosten (TIERGESUNDHEITSDIENST BAYERN, 2013; BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2016).

Mit wachsendem Anteil genetisch hornloser Tiere steigt auch die Zahl von Tieren, die Wackelhörner tragen. Wackelhörner – das sind, wie der Name schon sagt, Hörner, die wackeln. Sie sind nicht wie normale Hörner mit dem Stirnbein verwachsen, sondern sitzen lose auf der Haut und lassen sich dadurch verschieben. Ihre Gestalt unterscheidet sich in der Regel sehr deutlich von normalen Hörnern. Große Wackelhörner hängen meist nach unten und sind in Richtung des Kopfes gebogen. Der Begriff Wackelhorn schließt jedoch auch weitere Hornformen ein, welche man kaum mit ihm in Verbindung bringen würde. Dazu zählen Hornkrusten oder Hörner, die zwar einmal gewackelt haben, mit der Zeit jedoch fest mit dem Schädel verwachsen sind. In den meisten Fällen stellen Wackelhörner für Tier und Mensch kein Problem dar. Eher selten kommt es zu Verletzungen durch Abreißen oder ungünstiges Wachstum in Richtung des Kopfes (LANGE, 1989; LAMMINGER, 1999).

Das Interesse an Wackelhörnern und den zugrundeliegenden Ursachen ihrer Entstehung war schon seit dem Beginn der Hornloszucht beim Fleckvieh besonders groß. So erhalten Wackelhorn-tragende Tiere dieser Rasse sogar den speziellen Namenszusatz „S“ (von engl. *Scur* = Wackelhorn), der sie auf den ersten Blick als solche ausweist (BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2016).

Entgegen früherer Theorien ist erst seit der Entdeckung der Hornlosmutationen bekannt, dass Wackelhörner ausschließlich bei heterozygot, nicht aber bei homozygot hornlosen Tieren entstehen können (WIEDEMAR et al., 2014). Da jedoch nicht alle heterozygot hornlosen Rinder diese unvollständig entwickelten Hornformen aufweisen, stellt sich die Frage, welche genetischen Hintergründe ihr Wachstum bedingen.

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, eine genetische Kartierungsstudie über Wackelhörner und ihre Ausprägungsformen in der Fleckviehpopulation anzufertigen. Im Zuge dieser Aufgabe wurden weiterhin intensive Untersuchungen des zugrundeliegenden Phänotyps durchgeführt.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Horn, Hornlosigkeit und Wackelhorn

2.1.1 Geschichtliches: Vom Horn zur Hornlosigkeit

Hörner sind ein äußerst charakteristisches Merkmal für die Gattung der eigentlichen Rinder. Alle heute noch lebenden Arten (Amerikanisches Bison, Wisent, Gaur, Yak und Banteng) dieser Gattung sind in beiden Geschlechtern horntragend. In der Regel weisen männliche Tiere im Vergleich zu weiblichen Tieren größere und dickere Hörner auf (CASTELLÓ et al., 2016). Auch der ausgestorbene Auerochse als Vorfahr unserer Hausrinder trug mit rund 80 cm langen Hörnern bei den männlichen Tieren besonders große Hornexemplare (ORLANDO, 2015). Ursprünglich waren demnach alle unsere Hausrinder gehörnt.

Für das Sozialverhalten von wildlebenden Rindern haben Hörner eine große Bedeutung. Sie werden zur Abwehr von Feinden, zu Kämpfen während der Brunftzeit, zum Ausfechten der sozialen Rangordnung und zur Fellpflege eingesetzt. Durch die Obhut des Menschen haben diese Funktionen jedoch an Relevanz verloren (KNIERIM et al., 2015). Uneinigkeit herrscht darüber, ob Hörner auch physiologischen Funktionen wie zum Beispiel der Thermoregulation dienen (PICARD et al., 1999; BRO-JØRGENSEN, 2007).

Menschen nutzten das Horn des Rindes als Trinkgefäß (PANOFKA, 1851) oder verarbeiteten es zu Knöpfen, Kämmen, Pfeifenspitzen usw. Durch seinen hohen Stickstoffgehalt von 12–15 % wurde das Horn außerdem als Dünger verwendet (FORSCHUNGSINSTITUT FÜR BIOLOGISCHEN LANDBAU et al., 2016). Des Weiteren wurden Hörner bei den zur Feldarbeit eingesetzten Ochsen zur Befestigung des Zuggeschirrs genutzt (BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2016) oder die Tiere wurden mit Hilfe eines Seils um die Hörner angebunden.

Die Faszination des Menschen für das Horn spiegelt sich in der Mythologie vieler Kulturkreise wieder. Mythische Figuren und Götter trugen häufig Hörner auf ihrem Kopf oder als Helmschmuck. Dabei kann man auch wieder-

holt die Assoziation zwischen Horn und Fruchtbarkeit beobachten (DAVIS et al., 2014).

Im Laufe der Zeit tauchten in der Hausrinderpopulation immer wieder durch Mutation entstandene genetisch hornlose Rinder auf. So fand man schon unter ägyptischen Grabmalereien aus dem 3. Jahrtausend vor Christus Darstellungen von Rindern ohne Hörner. Obwohl sich nicht ausschließen lässt, dass bereits im Alten Ägypten Enthornungen praktiziert wurden (ROMAN, 2004), geht man doch davon aus, dass es sich beim Merkmal Hornlosigkeit um gezielte züchterische Selektion handelte (DRIESCH & PETERS, 2003). Auch im antiken Griechenland beschrieb Aristoteles (384–322 v. Christus) bereits eindeutig das Vorkommen von Rindern, die von Geburt an hornlos waren. Selbst Wackelhörner waren ihm bereits bekannt. Aristoteles umschrieb sie mit den Worten: „Rinder, die die Hörner bewegen wie die Ohren“ (ARISTOTELES et al., 1868a, 1868b).

Heutzutage verbindet man hornlose Rinder in erster Linie mit Rinderrassen, in denen die Hornlosigkeit schon seit dem 19. Jahrhundert zum Rassestandard gehört, wie zum Beispiel Aberdeen Angus, Galloway und Polled Hereford (SAMBRAUS, 2011). Mit zunehmender Intensität wird dieses Merkmal jedoch auch in ehemals gehörnte Rassen eingebracht. Der Grund hierfür liegt vor allem in der Änderung der Haltungsbedingungen von der Anbinde- zur Laufstallhaltung, da in der Laufstallhaltung das Verletzungsrisiko durch Hörner unter den Tieren selbst und auch für den Menschen allgemein als erheblich höher eingeschätzt wird. Aus dieser Veränderung resultierte, dass die Enthornung von Rindern mittlerweile zur gängigen Praxis geworden ist (WINDIG et al., 2015). Dies zeigt auch eine neuere Umfrage aus den Mitgliedstaaten der Europäischen Union. Laut dieser Studie werden 81 % der Milchrinder, 47 % der Fleischrinder und 68 % der in Mutterkuhhaltung lebenden Tiere enthornt (COZZI et al., 2015). Nichtsdestotrotz gibt es auch alternative Lösungsansätze. Diese lassen sich zum Beispiel in einer Laufstallhaltung mit größerem Platzangebot und einem guten Herdenmanagement verwirklichen (SCHNEIDER, 2010).

Enthornungen werden üblicherweise im Kalbesalter mittels heißem Brenneisen durchgeführt. In Deutschland sind sie momentan nach § 5 Absatz 3 Satz 2 Tierschutzgesetz bei Kälbern unter 6 Wochen noch betäubungsfrei erlaubt. Auch bei Gabe von Schmerz- und Beruhigungsmittel bleiben sie nachweislich schmerzhaft Eingriffe (CARAY et al., 2015). Darum stellt die Zucht hornloser Rinder einen wichtigen Beitrag zum Tierschutz dar (PRAYAGA, 2007). In der Folge hat die genetische Hornlosigkeit bereits in den ursprünglich gehörnten Rassen Holstein, Fleckvieh, Braunvieh, Charolais und Limousin Einzug gehalten (BOUQUET et al., 2011; SWALVE, 2013).

Auch wenn die Frequenz des Hornlosallels in diesen Rassen aktuell noch vergleichsweise niedrig ist, lässt sich doch eine vielversprechende Zukunft für die genetische Hornlosigkeit prognostizieren. Begünstigt wird diese Entwicklung sowohl durch die Politik, die sich bemüht, für mehr Tierwohl zu sorgen, als auch durch die Entdeckung der kausalen Allele und der Nutzung neuer züchterischer Errungenschaften wie die genomische Selektion. Eine tragende Rolle spielt außerdem eine zum Positiven veränderte Grundhaltung vieler Landwirte gegenüber genetisch hornlosen Rindern (SCHAFBERG & SWALVE, 2015).

2.1.2 Anatomie des Rinderhorns

Die äußere Gestalt der Hörner weist auch bei den Hausrindern vom Geschlecht abhängige Unterschiede auf. So lassen sich die Hörner der Kühe in der Regel als lang und schmal, die der Bullen als kurz und dick und die der Ochsen als lang und dick beschreiben (BUDRAS & WÜNSCHE, 2002). Der Aufbau des Horns (Abb. 1) basiert auf einem langen, spitz zulaufenden Knochenzapfen, der mit zunehmendem Alter pneumatisiert. Der Knochenzapfen wird überzogen vom *Periost*, der Knochenhaut. Darüber liegt die Gefäße und Nerven führende Lederhaut, auch *Corium* genannt. Es folgt die *Epidermis*, die lebenslang Horn produziert. Sie ist verantwortlich für die Bildung der äußersten Schicht, der epidermalen Hornscheide, die als Horn im eigentlichen Sinne gesehen wird (NICHEL et al., 2004).

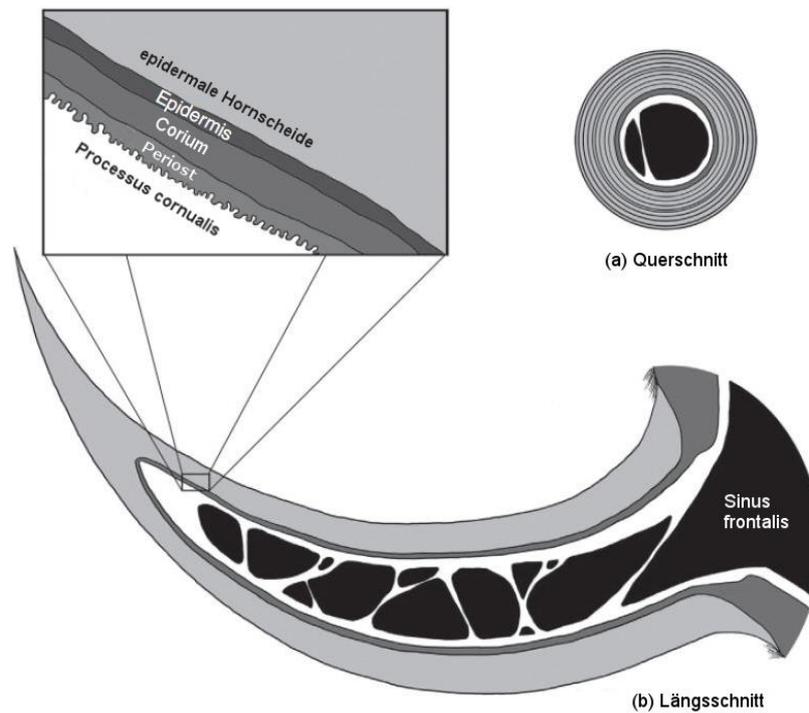


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Längs- und Querschnitts durch das Horn einer adulten Kuh (a) Querschnitt, der die Wachstumsringe des eigentlichen Horns zeigt (b) Längsschnitt, der den knöchernen Hornzapfen mit dem eingewachsenen Frontalsinus darstellt und eine vergrößerte Ansicht der einzelnen Gewebeschichten zeigt (Quelle: DAVIS et al., 2014)

2.1.3 Entwicklung und Wachstum des Rinderhorns

Die Hornansätze treten beim Fetus bereits im dritten Trächtigkeitsmonat als kleine Höckerchen in Erscheinung (KÖNIG & LIEBICH, 2014). Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich zu dieser Zeit auch dicke Nervenbündel in der *Dermis* der Hornknospen bilden. Diese Nervenbündel sind das Hauptunterscheidungsmerkmal im Vergleich zur sonstigen Stirnhaut und deuten auf die besondere Empfindsamkeit der Hornknospen hin. Weitere Unterschiede im Vergleich zur Stirnhaut sind die zusätzlichen Lagen von Keratinozyten in der *Epidermis*, die jedoch nur im 2.–6. Trächtigkeitsmonat vorhanden sind, und das Fehlen von Haarfollikeln zwischen dem 2.–4. Trächtigkeitsmonat (WIENER et al., 2015).

Bei der Geburt eines Kalbes ist die Stelle der Hornanlage äußerlich in der Regel durch einen Haarwirbel und eine mittig angelegte haarlose Stelle gekennzeichnet (KÖNIG & LIEBICH, 2014). Wie DOVE bereits 1935 mithilfe von Transplantationsversuchen herausfand, wird das Hornwachstum durch das *Corium* und das darunter liegende Bindegewebe der Hornknospe induziert. Der sich entwickelnde Hornfortsatz (*Processus cornualis*) ist bis zum 6. Lebensmonat massiv. Ab diesem Zeitpunkt kommt es langsam zum Einwachsen der Stirnhöhenschleimhaut und damit zur Pneumatisation. Diese schreitet normalerweise so lange fort, bis das gesamte Horn mit Ausnahme der Spitze hohl ist. Der Zeitpunkt des Beginns der Pneumatisation ist für die Klinik von großer Bedeutung, da man bei einer späten Enthornung von einer Eröffnung der Stirnhöhle ausgehen muss (KÖNIG & LIEBICH, 2014). Über den Verlauf der Pneumatisation ist jedoch eher weniger bekannt.

Der Berner Universitätsprofessor Johann Ulrich DUERST (1926) untersuchte die Pneumatisation der Hörner verschiedener Haus- und Wildwiederkäuer. Er kam zu dem Schluss, dass die Faktoren Gewicht und Position der Hörner am Schädel Einfluss auf die Pneumatisation nehmen könnten. Um diese These zu untermauern, ließ er bei einem jungen Schafbock ein Horn durch Hitzebehandlung so verformen, dass es anstatt schneckenförmig gewunden eine waagrechte Ausrichtung hatte. Als das Tier nach zwei Jahren geschlachtet wurde, war eine deutliche Pneumatisation des waagrecht gewachsenen Horns ersichtlich. Das unbehandelte Horn war dagegen zu diesem Zeitpunkt noch durchgängig massiv. DUERST beschrieb außerdem, dass die Pneumatisation der Hörner auch in einem hohen Maße von der individuellen Entwicklung eines Tieres abhängig ist.

Form und Gestalt von Hörnern werden von mehreren Faktoren bestimmt. Neben der genetischen Komponente sind Stoffwechsel und Hormonhaushalt eines Tieres zu nennen. So kommt es beispielsweise in Zeiten mit mangelndem Nahrungsangebot oder bei Krankheit zu einer geringeren Hornbildungsrate, die sich durch Einschnürungen am Horn bemerkbar macht. Bei Kühen entsteht eine solche Einschnürung aufgrund der erhöhten Stoffwechselleistung am Ende der Trächtigkeit und dem Beginn der Laktation bei jeder Geburt eines Kalbes. Geht man davon aus, dass eine Kuh ge-

wöhnlich im Alter von zwei Jahren das erste Kalb bekommt und jedes Jahr einmal kalbt, kann man anhand der Anzahl von Furchen +2 das Alter des Tieres abschätzen.

Der hormonelle Einfluss ist an der unterschiedlichen Hornform von Bulle und Ochse ersichtlich (NICKEL et al., 2004). Die Hörner von sowohl weiblichen als auch männlichen Frühkastraten sind in der Regel länger und im Umfang schmaler als die ihrer unkastrierten Geschlechtsgenossen (DUERST, 1926).

2.1.4 Genetik des Rinderhorns

In den gängigen Vererbungstheorien über Hörner, Hornlosigkeit und Wackelhörner bei Rindern wurde stets ein einzelner Genlocus für Hörner angenommen und als H-Locus (von engl. *horns* = Hörner) bezeichnet. Bei indigenen Afrikanischen Rindern wurde ein zweiter Hornlocus vermutet, den man Ha (von engl. *African horn* = Afrika Horn) nannte. Die Annahme eines zweiten Hornlocus bei afrikanischen Rindern entstand durch die Tatsache, dass Hornlosigkeit in afrikanisch *taurinen* im Vergleich zu europäisch *taurinen* Rindern nicht vollständig dominant vererbt wird. Dieser Umstand ließ sich auch in weiteren Rassen, allerdings mit wesentlich geringerem Vorkommen beobachten (WHITE & IBSEN, 1936; LONG & GREGORY, 1978).

Heutzutage geht man davon aus, dass die Hornausbildung grundsätzlich nicht nur von einem einzelnen Genlocus gesteuert wird (z.B. ALLAIS-BONNET et al., 2013). Allerdings sind die beteiligten Gene bisher nicht sicher identifiziert.

Einen Ansatz, um solche Gene ausfindig zu machen, stellt die Betrachtung genetisch bedingter Syndrome, die unter anderem Auswirkungen auf den Hornstatus eines Tieres haben, dar. In der Rinderrasse Charolais wurden unlängst zwei solcher Syndrome entdeckt. Zum einen das Bovine Wackelhornsyndrom Typ 2 (*Bovine Type 2 scurs syndrome, T2SS*), das in Kapitel 2.1.6.4 näher erläutert wird, zum anderen ein Hornlosigkeits-

Multisystemersyndrom (*Polled and multisystemic syndrome, PMS*), welches in Kapitel 2.1.6.5 beschrieben wird. *T2SS* wird durch eine Mutation im Gen *TWIST1* (*twist family bHLH transcription factor 1*) ausgelöst. *PMS* wird entscheidend durch die Funktionsunfähigkeit von *ZEB2* (*zinc finger E-box binding homeobox 2*) beeinflusst. Somit wird gefolgert, dass *TWIST1* und *ZEB2* auch eine Rolle beim Hornwachstum spielen könnten. Beide Gene haben zudem eine Gemeinsamkeit – sie sind Hauptregulatoren für die Umwandlung von Epithelzellen in Mesenchymzellen, auch Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT) genannt (CAPITAN et al., 2011; CAPITAN et al., 2012).

In aktuellen Studien steht die Forschung zur Genexpression während der Hornentwicklung im Mittelpunkt. Dazu werden Feten und Kälber mit unterschiedlichem Hornstatus verwendet. So sind die Tiere entweder hetero- oder homozygot hornlos, Wackelhorn-tragend oder gehörnt. Zudem werden Feten mit den auslösenden Mutationen der beiden Syndrome *T2SS* und *PMS* erzeugt. Die Beprobung der Tiere erfolgt über eine Gewebeentnahme an der Hornansatzstelle. Im Anschluss daran wird auf Vorhandensein und Frequenz der exprimierten Gene getestet. In den bisherigen Studien wurden folgenden Vergleiche gezogen:

- Gleichaltrige Tiere mit unterschiedlichem Hornstatus
- Verschieden alte Tiere mit gleichem Hornstatus
- Gewebe der Hornansatzstelle verglichen zur umliegenden Stirnhaut

(MARIASEGARAM et al., 2010; ALLAIS-BONNET et al., 2013; WIEDEMAR et al., 2014).

Aufgrund von unterschiedlicher Genexpression ergaben sich aus diesen Ansätzen mehrere Kandidatengene für Hornwachstum, wie zum Beispiel *FOXL2* (*forkhead box L2*), das bei Mutation auch für ein Hornlosigkeit bedingendes Syndrom (*Polled and intersexuality syndrome = PIS*) in Ziegen auslösend ist (BOULANGER et al., 2014). Weitere Kandidatengene sind *RXFP2* (*relaxin family peptide receptor 2*), dessen Mutation mit Hornlosigkeit bei Schafen assoziiert ist (WIEDEMAR & DRÖGEMÜLLER, 2015; LÜHKEN et al., 2016), und *OLIG2* (*oligodendrocyte transcription factor 2*),

das sich in der Nähe der Hornlosmutationen des Rindes befindet (ALLAIS-BONNET et al., 2013; WIEDEMAR et al., 2014). Weiterhin wurde eine nichtcodierende RNA des Genorts LOC100848215 ermittelt. Diese RNA war nur bei gehörnten Tieren vorhanden, während sie im Gewebe von hetero- oder homozygot hornlosen Tieren nicht nachweisbar war. Daraufhin prüfte man ihr Vorkommen auch bei anderen Spezies (Schwein, Hund, Ratte, Maus, Mensch und Büffel) und stellte fest, dass sie ausschließlich beim Büffel ausfindig zu machen war. Bei der RNA von LOC100848215, deren Funktion bisher nicht bekannt ist, scheint es sich demnach um eine Besonderheit von horntragenden Wiederkäuern zu handeln. Zudem liegt LOC100848215 in unmittelbarer Nähe zu den Hornlosmutationen des Rindes (WIEDEMAR et al., 2014).

2.1.5 Hornlosmutationen

Hornlosigkeit wird bei *taurinen* Rindern autosomal dominant vererbt. Dieser Fakt wurde von vielen Autoren beschrieben und durch Kreuzungsversuche bestätigt. Man gab dem Hornloslocus den Namen P-Locus (von engl. *polled* = hornlos). Die beiden möglichen Allele dieses Genorts werden durch die Buchstaben P und p beschrieben. Dabei steht P für das Allel, das Hornlosigkeit auslöst, und p dementsprechend für das ancestrale Allel, welches dies nicht tut. Aufgrund des dominanten Charakters des Hornlosallels P sind Tiere mit der Allelkombination PP und Pp hornlos, während Tiere mit der Allelkombination pp Hörner tragen (SPILLMAN, 1905; WHITE & IBSEN, 1936; LONG & GREGORY, 1978).

Das Gen für Hornlosigkeit im Rindergenom wurde erstmals von GEORGES et al. im Jahr 1993 lokalisiert. Sie konnten den P-Locus auf dem proximalen Abschnitt des Rinderchromosoms 1 (*BTA1*) ermitteln. Es sollten jedoch noch knapp 20 Jahre mit mehreren Studien zum Thema vergehen (BADER, 2001; DRÖGEMÜLLER et al., 2005; WUNDERLICH et al., 2006), bevor es MEDUGORAC et al. (2012) gelang, die molekulare Basis der Mutation aufzudecken. Die Schwierigkeit entstand dabei durch das Vorhandensein unterschiedlicher Mutationen am gleichen Genort, was als allelische Hetero-

genität bezeichnet wird. MEDUGORAC et al. beschrieben zwei Varianten, die durch den jeweiligen geographischen Ursprung einer Rinderrasse bedingt sind. Zum einen die friesische Hornlosmutation, die in den Rassen Holstein, Jersey und Witrug vorkommt und mit P_F (F von engl. *Friesian* = friesisch) bezeichnet wird. Zum anderen die keltische Hornlosmutation, die in Fleckvieh, Braunvieh, Hereford, Galloway und vielen weiteren europäischen Fleisch- und Doppelnutzungs-rinderrassen zu finden ist und die mit P_C (c von engl. *Celtic* = keltisch) gekennzeichnet wird. In Abbildung 2 sind die Verbreitungen beider Mutationen innerhalb der europäischen Rinderrassen graphisch dargestellt. Durch Einkreuzungen von Fremdblut kann es auch zum parallelen Auftreten beider Hornlosvarianten innerhalb einer Rasse kommen. Das ist zum Beispiel beim Fleckvieh durch die Einkreuzung von Red Holstein der Fall. Die keltische Hornlosmutation stellt eine 202 bp lange Insertion-Deletion (*InDel*) dar. Die friesische Hornlosmutation konnten MEDUGORAC et al. auf ein 260 kb umfassendes Gebiet eingrenzen, woraufhin kurze Zeit später eine 80 kb Duplikation als ursächlich für die friesische Variante gefunden wurde (ROTHAMMER et al., 2014). Die Kausalität der keltischen Mutation und damit auch indirekt die der friesischen konnte durch zwei geneditierte und in der Folge hornlose Kälber bewiesen werden (CARLSON et al., 2016). Kürzlich wurde eine dritte Hornlosmutation im domestizierten Yak identifiziert. Die Herkunft dieser Mutation entstammt Einkreuzungen von mongolischen Turano-Rindern. Die zusammengesetzte und daher komplexe Mutation, die den Namen P_M (M von engl. *Mongolian* = Mongolisch) erhielt, befindet sich wie die beiden anderen Hornlosmutationen auf dem proximalen Abschnitt von *BTA1* innerhalb des 80 kb Bereichs, der für die friesische Mutation verantwortlich ist. Damit liegen alle drei Hornlosmutationen in nicht codierenden DNA-Abschnitten. In der Folge konnten die molekularen Mechanismen, welche Hornlosigkeit bedingen, bisher noch nicht aufgeklärt werden (MEDUGORAC et al., 2017).

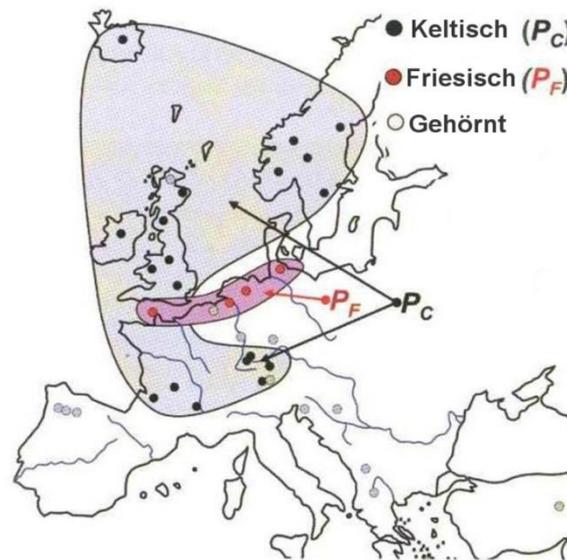


Abbildung 2: Vorkommen von keltischer und friesischer Hornlosmutation in mehr als 50 europäischen Rinderrassen (Quelle: MEDUGORAC et al., 2012)

Nach der Beschreibung von keltischer und friesischer Hornlosmutation wurde nach weiteren Merkmalen gesucht, die zusammen mit Hornlosigkeit auftreten. Dabei fand man eine phänotypische Besonderheit, die bisher nur bei hornlosen Bullen der Rasse Charolais beobachtet wurde. Es handelt sich um ein abnormales Einziehen des Präputiums (ALLAIS-BONNET et al., 2013). Ursächlich ist sehr wahrscheinlich eine fehlende oder schwächer ausgebildete Präputialmuskulatur. Diese tritt laut Literatur auch in anderen hornlosen Rassen gehäufiger auf (RICE, 1987; BRUNER & VAN CAMP, 1992).

Ein weiteres mit Hornlosigkeit assoziiertes Merkmal, das völlig neu beobachtet wurde, stellt eine Auffälligkeit der Wimpern dar. Diese wachsen bei hornlosen Tieren oftmals mehrreihig, abnormal lang oder in Richtung des Augapfels (*Distichiasis*). Außerdem wurde eine dunklere Farbe und eine ungewöhnliche Orientierung der Wimpern bei pigmentierten Tieren festgestellt (ALLAIS-BONNET et al., 2013). Interessanterweise wird *Distichiasis* beim Menschen durch Mutationen in den Genen *FOXC2* (*forkhead box C2*) (FANG et al., 2000) und *TWIST2* (*twist family bHLH transcription factor 2*)

(CERVANTES-BARRAGAN et al., 2011) ausgelöst. Diese beiden Gene stellen paraloge, das bedeutet zu einer Genfamilie gehörende Gene zu *FOXL2* und *TWIST1* dar. Mutationen von *FOXL2* und *TWIST1* sind wie in Kapitel 2.1.4 angesprochen mit fehlenden bzw. unvollständig entwickelten Hörnern bei Wiederkäuern assoziiert (CAPITAN et al., 2011; BOULANGER et al., 2014). Beim Menschen wiederum führt ein vollständiges Fehlen von *TWIST2* zu beidseitig auftretenden, klar abgegrenzten Hautläsionen an den Schläfen (TUKEL et al., 2010). Diese Beobachtungen sprechen für eine sparsame Arbeitsweise der Evolution. Scheinbar werden keine Gene, die ausschließlich für Hornwachstum codieren neu erfunden, sondern eher bereits vorhandene Netzwerke, die auch für andere Hautanhänge an einem bestimmten Körpersegment von Bedeutung sind, weiterentwickelt (ALLAIS-BONNET et al., 2013)

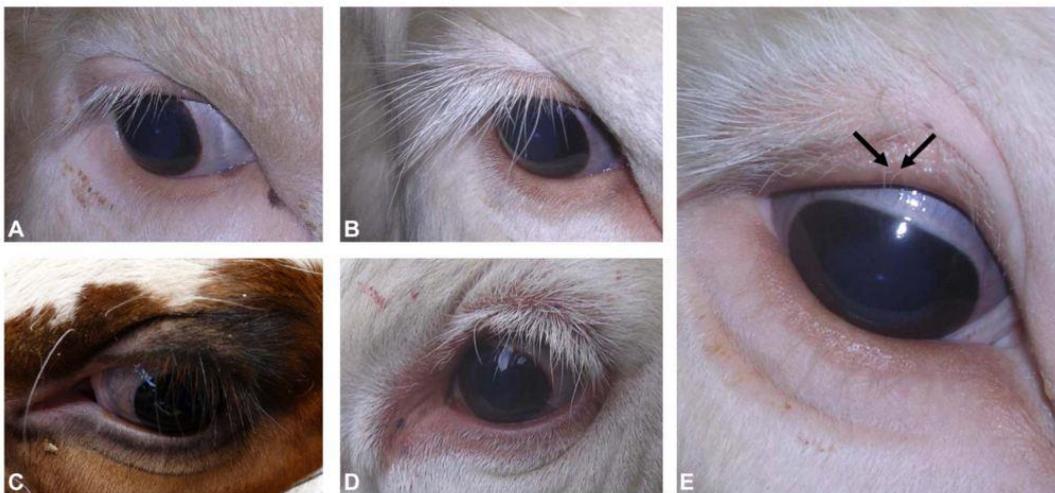


Abbildung 3: Nahaufnahmen der Wimpern hornloser Tiere (A) Auge eines gehörnten Bullen, (B, D u. E) Augen von PC/p Charolais Bullen, (C) Auge einer PF/p Holstein Kuh; Die Bilder B, C, D und E zeigen die typischen mehrreihigen und zum Teil überlangen Wimpern hornloser Tiere. In Bild C ist die dunklere Färbung bei einem pigmentierten Tier zu erkennen und Bild E zeigt ein Beispiel für Distichiasis (Quelle: ALLAIS-BONNET et al, 2013)

2.1.6 Wackelhörner

2.1.6.1 Formen und Entwicklung von Wackelhörnern

Wackelhörner sind unvollständig entwickelte Hörner. Sie sind äußerst vielfältig. Ihre Formen reichen von kleinen hornigen Krusten, auch Grind genannt, bis zu augenscheinlich beinahe normalen Hörnern. Letztere sind allerdings eine Seltenheit. Wackelhörnern fehlt im Gegensatz zu normal entwickelten Hörnern eine knöcherne Verbindung zum Schädel. Sie sitzen auf der Haut und lassen sich zusammen mit dieser bewegen. Jedoch kann es im Alter eines Tieres nachträglich zu einer festen Verwachsung mit dem Schädelknochen kommen. Eine weitere Besonderheit ist der mögliche Verlust von kleinen Krusten, der durch Abrieb verursacht werden kann. Wackelhörner können ein- oder beidseitig ausgebildet sein (LANGE, 1989; LAMMINGER, 1999). Durch die fehlende knöcherne Fixierung hängen größere Wackelhörner häufig gewichtsbedingt nach unten und wurden deshalb in früherer Zeit auch als „Bananenhörner“ bezeichnet (DIRKSEN, 2006). Abbildung 4 zeigt die verschiedenen Formen von Wackelhörnern im Fleckvieh.



Abbildung 4: Formen von Wackelhörnern beim Fleckvieh (A) Kalb mit feiner Kruste, (B) Bulle mit ausgeprägter Kruste, (C) Kuh mit kleinem Wackelhorn auf Stirnbeule, (D) Kuh mit mittelgroßem Wackelhorn, (E) Bulle mit großen Wackelhörnern, (F) Seltenheit: Bulle mit fest angewachsenen, großen Wackelhörnern, die normalen Hörnern gleichen (Quelle: private Aufnahmen)

Eine Sonderform ist die Stirnbeule. Sie stellt eine knöcherne, meist halbkugelförmige Erhebung an der Hornansatzstelle dar. Stirnbeulen werden im Allgemeinen nicht den Wackelhörnern zugeordnet, sondern eher als eine mögliche Vorstufe angesehen. LANGE (1989) und LAMMINGER (1999) waren jedoch der klaren Auffassung, dass Tiere mit deutlichen Stirnbeulen bei genetischen Studien wie Tiere mit Wackelhörnern behandelt werden müssen.



Abbildung 5: Große Stirnbeulen einer Fleckviehkuh (ausgeschoren)

(Quelle: private Aufnahme)

Wackelhörner, die größer als 2 cm sind, haben in der Regel einen soliden knöchernen Kern, der von Horn ummantelt ist. Größere Wackelhörner werden häufiger bei männlichen Tieren beobachtet. Weibliche Tiere zeigen hingegen vermehrt Krusten und kleinere Wackelhörner. Aufgrund dieser kleineren Ausprägungsformen gestalten sich visuelle Hornstatusbestimmung häufig schwierig. Gelegentlich kann selbst eine manuelle Inspektion eine Herausforderung für die untersuchende Person darstellen (DOVE, 1935).

Für gewöhnlich entwickeln sich Wackelhörner später als normale Hörner. SPIRE et al. (1981) beschreiben diesen Umstand mit besonderem Augenmerk auf weiblichen Tieren. Während die meisten männlichen Tiere im Alter von einem Jahr bereits Wackelhörner aufweisen, beginnen weibliche Tiere zu diesem Zeitpunkt häufig erst mit deren Ausbildung.

2.1.6.2 Künstlich erzeugte „Wackelhörner“

Im Rahmen seiner Transplantationsversuche zur Induktion des Hornwachstums konnte DOVE (1935) die Entstehung künstlicher Wackelhörner beobachten. Er entfernte die verschiedenen Gewebeschichten der Hornansatzstelle einzeln und in Kombination und transplantierte sie auf eine andere Hautstelle am Körper eines Tieres. Als er *Periost* und das darüberliegende Bindegewebe von der Hornansatzstelle seiner Kälber entfernte, wuchsen an der Stelle kleine, verschiebbare Horngebilde mit knöchernem Kern. Diese Beschreibung deckt sich vollständig mit der eines genetisch bedingten Wackelhorns.

In der Praxis entstehen wackelhornähnliche Formen, auch Stummel- oder Krüppelhörner genannt, als Folge einer unvollständigen Enthornung mittels heißem Brenneisen (DIRKSEN, 2006). Das ist zum Beispiel der Fall, wenn der Brennring eines Enthornungsgerätes zu klein ist, um die komplette Hornknospe zu umschließen, oder bei zu kurzer Dauer des Brennvorgangs (KURATORIUM FÜR TECHNIK UND BAUWESEN IN DER LANDWIRTSCHAFT E.V., 2016). Stummelhörner können optisch häufig nicht von Wackelhörnern unterschieden werden. So kann es sehr leicht zu Verwechslungen kommen.

2.1.6.3 Theorien und Fakten zur Genetik von Wackelhörnern

Männliche Tiere entwickeln wesentlich häufiger Wackelhörner als weibliche Tiere dies tun. Zu diesem Ergebnis kamen viele Untersuchungen über Hornlosigkeit und Wackelhörner in verschiedenen Rassen. Beispielhaft seien die Studien von WHITE und IBSEN (1936) über Kreuzungstiere aus Galloway und Holstein, von LONG und GREGORY (1978) über Kreuzungstiere aus Aberdeen Angus, Polled Hereford und Hereford und von BREM et al. (1982) über das Fleckvieh genannt. Aufgrund dieser Beobachtungen sahen die genannten Autoren das Gen für Wackelhörner in männlichen Tieren als dominant und in weiblichen Tieren als rezessiv an und stellten es gleichermaßen in den von ihnen aufgestellten Vererbungsmodellen dar. In

jüngerer Vergangenheit beschäftigten sich CAPITAN et al. (2009) mit Wackelhörnern in der französischen Rinderrasse Charolais und fanden heraus, dass bei dieser Rasse das Verhältnis von männlichen und weiblichen Tieren, die Wackelhörner tragen, gleich hoch ist. Schlussfolgernd charakterisierten sie das Wackelhorngen im Charolais als autosomal rezessiv mit gleicher Penetranz in beiden Geschlechtern.

In den genannten Vererbungsmodellen von WHITE und IBSEN (1936), LONG und GREGORY (1978) und BREM et al. (1982) wurden Wackelhörner stets einem monogenen Erbgang zugerechnet. Der Wackelhornlocus wurde als Sc (von engl. *scurs* = Wackelhörner) bezeichnet und mit den Allelen Sc und sc versehen. Insbesondere das Vererbungsmodell nach LONG und GREGORY (1978) ist bis heute gängig geblieben. Damals wie heute gab und gibt es aber auch eine Reihe von Alternativhypothesen und Erweiterungen zu diesen Modellen. So erwogen WILLIAMS und WILLIAMS bereits 1952 das Vorkommen eines weiteren Gens oder eine Beteiligung von Umwelteinflüssen an der Wackelhornbildung. Einige Jahrzehnte später überlegte LANGE (1989), wodurch die Größenunterschiede von Wackelhörnern genetisch zu erklären sind. Er stellte dazu zwei neue Vererbungsmodelle auf. Bei einem wird die Größe durch verschiedene Allele am Hornlocus bestimmt, während beim anderen ein zusätzliches Gen die Größe modifiziert. LAMMINGER (1999), der sich wie LANGE mit Wackelhörnern im Fleckvieh beschäftigte, fand in seinem Probenmaterial Fälle, die sich nicht mit dem Vererbungsmodell nach LONG und GREGORY erklären ließen. So beobachtete er Wackelhorn-freie, heterozygot hornlose Bullen mit Wackelhorn-tragenden Töchtern oder Müttern. Da Wackelhorn-freie, heterozygot hornlose Bullen bei dominanter Vererbung jedoch kein Wackelhornallel besitzen dürften, können sie auch keines an ihre Töchter weitergeben bzw. eines von der Mutter ererbt haben. Daraufhin ergänzte LAMMINGER (1999) das Vererbungsmodell von LONG und GREGORY mit der Theorie vom maternalen *Imprinting*. *Imprinting* oder zu Deutsch genomische Prägung stellt ein epigenetisches Phänomen dar. Dabei werden Gene eines Elternteils infolge einer Markierung, bei der es sich im Wesentlichen um eine DNA-Methylierung handelt, in den Nachkommen nicht exprimiert (GRAW, 2015). In Bezug auf die Wackelhornausprägung bedeutet dies,

dass Bullen, die ihr Wackelhornallel von der Mutter ererbt haben, dieses modifizierte Allel nicht phänotypisch zeigen, es aber an ihre Nachkommen weitergeben können.

Im Jahr 2004 wurde der Wackelhornlocus von ASAI et al. mittels Kopplungsstudie auf *BTA19* kartiert. Das verwendete Tiermaterial umfasste mehrere Rassen, darunter auch Charolais und Fleckviehtiere. Während CAPITAN et al (2009) den kartierten Locus im französischen Charolais nicht verifizieren konnten, gab es bei der Assoziationsstudie von TETENS et al. (2015) im Fleckvieh zumindest einen Hinweis, der ebenfalls auf Chromosom 19 deutete. TETENS et al. hatten 150 heterozygote Fleckviehtiere für ihre Analyse verwendet und kamen aufgrund des Ausbleibens höhersignifikanter Ergebnisse zu dem Schluss, dass es mehr als einen beeinflussenden Genlocus für Wackelhörner geben müsse. Bereits vor der Studie hatte man über diese Möglichkeit spekuliert und außerdem unvollständige Penetranz bei der Wackelhornausbildung vermutet (WIEDEMAR et al., 2014).

Mithilfe des neuen Wissens um die Hornlosmutationen und des nun durchführbaren Hornlostests kamen WIEDEMAR et al. in ihrer Studie von 2014 zu einer entscheidenden neuen Erkenntnis über Wackelhörner. Sie testeten dafür 207 Wackelhornträger verschiedener Rassen auf Hornlosigkeit. Alle Tiere hatten ausschließlich ein P-Allel. Wackelhörner werden demnach nur bei heterozygot hornlosen Tieren exprimiert. Damit konnten WIEDEMAR et al. eine Kernthese der bekanntesten Vererbungsmodelle (WHITE & IBSEN, 1936; LONG & GREGORY, 1978; BREM et al., 1982) widerlegen. Bis dahin war man der Auffassung gewesen, dass homozygot hornlose Tiere sehr wohl Wackelhörner entwickeln können. Tatsächlich lag der Unterschied der oben genannten Modelle genau in dieser Tiergruppe. Die Autoren waren hier verschiedener Meinung, welche homozygot hornlosen Tiere in Kombination mit Geschlecht und Wackelhornallelen Wackelhörner auch phänotypisch ausprägen.

2.1.6.4 Bovines Wackelhornsyndrom Typ 2 (Bovine type 2 scurs syndrome = T2SS)

Bei der Suche nach dem genetischen Hintergrund von Wackelhörnern im Charolais entdeckten CAPITAN et al. (2011) Tiere mit Wackelhörnern, die kein Hornlosallel trugen. Es folgten genauere Untersuchungen der betroffenen Tiere, um den Ursprung dieser neuen Art von Wackelhörnern zu ergründen. Klinisch ließen sich verschiedene Grade einer abnormal spitzen Schädelform, auch *Acrocephalie* genannt, und eine vermehrte Knochenzubildung an der interfrontalen Knochennaht des Schädels feststellen. Diese Symptome schienen in negativer Korrelation zur Größe der Wackelhörner zu stehen. Weiterhin war eine ungleichförmige Keratinschicht auffallend, von der kleinere Wackelhörner vollständig umgeben waren und die bei größeren Wackelhörnern vor allem am Hornende auftrat. In einer genomweiten Kopplungsanalyse war es möglich, ein 1,7 Mb großes Intervall auf *BTA4* zu kartieren. Als wahrscheinlichstes Kandidatengen in diesem Abschnitt wurde das *TWIST1* Gen ermittelt. Seine Mutation ruft beim Menschen das sogenannte Saethre-Chotzen-Syndrom hervor. Dabei kommt es, wie auch bei den Rindern beobachtet, unter anderem zu einer *Acrocephalie*. Diese entsteht in Folge einer zu frühen Verknöcherung der Knochennahte des Schädels. CAPITAN et al. konnten beim Vergleich betroffener mit gesunden Tieren tatsächlich eine Mutation in diesem Gen feststellen. Es handelte sich um eine zehn Basenpaare lange Duplikation, die das Leseraster der DNA verschiebt und damit wohl das gesamte *TWIST1* Gen inaktiviert. Betroffene Tiere waren stets heterozygot für diese Mutation. Daher liegt die Vermutung nahe, dass wie bei *Drosophila* (SIMPSON, 1983) und Mäusen (CHEN & BEHRINGER, 1995) nachgewiesen, die vollständige Funktionsunfähigkeit von *TWIST1* auch bei Rindern zum embryonalen Tod führt (CAPITAN et al., 2011).

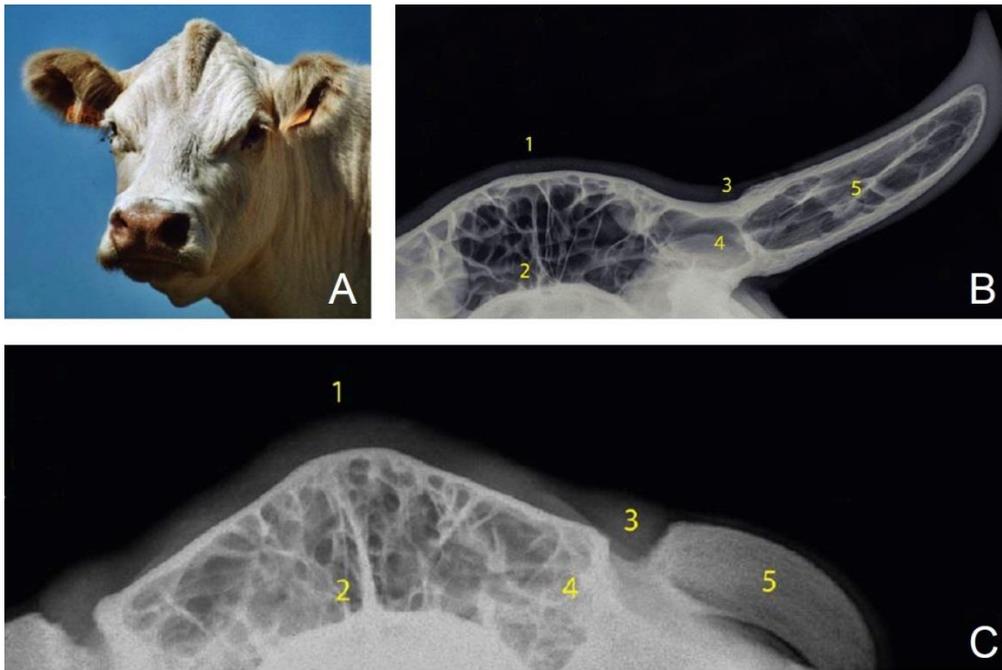


Abbildung 6: Bovines Wackelhornsyndrom Typ 2 (T2SS) (A) 10-jährige T2SS Charolaiskuh mit Krusten und ausgeprägter Knochenzubildung an der Interfrontalnaht des Schädels, (B) Röntgenaufnahme des Schädels einer 5-jährigen gehörnten Charolaiskuh, (C) Röntgenaufnahme des Schädels einer 4-jährigen T2SS Charolaiskuh mit langen Wackelhörnern; C verglichen zu B: 1. Acrocephalie, 2. Vermehrte Kalzifikation der Interfrontalnaht, 3. Fehlende Verschmelzung des Stirnbeins mit dem Os cornu, 4. Fehlende Aufwärtsorientierung des Stirnbeins, 5. Fehlende Pneumatisation des Horns (Quelle: Capitan et al., 2011)

2.1.6.5 Hornlosigkeits-Multisystemsindrom (*Polled and multisystemic syndrome = PMS*)

Kurze Zeit nach der Entdeckung des Bovinen Wackelhornsyndrom Typ 2 fanden CAPITAN et al. (2012) ein weiteres mit Hornlosigkeit assoziiertes Syndrom. Es betraf ausschließlich die Nachzucht eines einzigen Charolais-Bullen. Dieser Bulle entwickelte trotz gehörnter Eltern keine Hörner, sondern ausschließlich Krusten. Ein Teil seiner Kälber war vollständig hornlos und zeigte zudem eine Reihe anderer Symptome. Die betroffene Nachzucht litt an Veränderungen des Gesichtsschädels ähnlich denen, die auch beim Bovinen Wackelhornsyndrom Typ 2 auftreten. Weiterhin wurden Wachstumsverzögerungen, eine vorzeitige Ovarialinsuffizienz bei weiblichen Tie-

ren, chronische Durchfälle, verschiedene neurologische Funktionsstörungen und kardiale Anomalien festgestellt. CAPITAN et al. konnten die genetische Ursache in Form einer großen Deletion auf *BTA2* ermitteln. Von den drei im Bereich der Mutation liegenden Genen wurde die Funktionsunfähigkeit von *ZEB2* als hauptverantwortlich für die umfangreiche Symptomatik angenommen. Denn ein defektes *ZEB2* sorgt beim Menschen für das sogenannte Mowat-Wilson-Syndrom, dessen Symptome dem bovinen Hornlosigkeit-Mutisystemsyndrom stark ähneln.

Unter der mutationstragenden Nachzucht des Bullen waren überproportional viele weibliche Tiere. CAPITAN et al. vermuteten daher eine erhöhte Letalität von männlichen Tieren während der Trächtigkeit, die sie in weiteren Untersuchungen auch nachweisen konnten. Damit stellten sie den selten auftretenden Fall einer erhöhten männlichen Letalität, die durch einen autosomalen Genort bedingt wird, vor.

2.2 Die Rinderrasse Deutsches Fleckvieh

2.2.1 Rassemerkmale und Herkunft des Deutschen Fleckviehs

Das Deutsche Fleckvieh ist ein mittelgroßes bis großrahmiges Rind mit guter Bemuskelung. Die charakteristisch gescheckte Fellzeichnung der Rasse variiert von großflächig gedeckt bis geringgradig gefleckt. Dabei sind der Kopf bis hinter die Augen, große Teile der Beine und die Schwanzquaste in der Regel weiß. Die ebenfalls typische Fellfarbe reicht von hellem Gelb bis zu dunklem Rotbraun (Abb. 7). Fleckviehtiere können behornt oder genetisch hornlos sein. Im Allgemeinen handelt es sich beim Deutschen Fleckvieh um eine Zweinutzungsrasse, bei der auf die Merkmale Milch- und Fleischleistung gleich viel Wert gelegt wird. Weiterhin existiert auch eine zahlenmäßig kleinere reine Fleischlinie (SAMBRAUS, 2011). Der Ursprung des Deutschen Fleckviehs lässt sich auf den Anfang des 19. Jahrhunderts datieren. Um 1830 wurden dann die ersten Rinder zum Zwecke der Verbesserung lokaler Landschläge aus dem Berner Oberland (Simmental) nach Deutschland importiert. Durch ihre überzeugende Milch- und Zugleis-

tung etablierten sich die Tiere durch Verdrängungskreuzung rasch im gesamten süddeutschen Raum (ARBEITSGEMEINSCHAFT SÜDDEUTSCHER RINDERZUCHT- UND BESAMUNGSSTATIONEN E.V. & CENTRALE MARKETING-GESELLSCHAFT DER DEUTSCHEN AGRAR-WIRTSCHAFT MBH., 2007). In Deutschland wird die Bezeichnung Simmentaler daher auch heute noch synonym zur Bezeichnung Fleckvieh verwendet (SAMBRAUS, 2011).

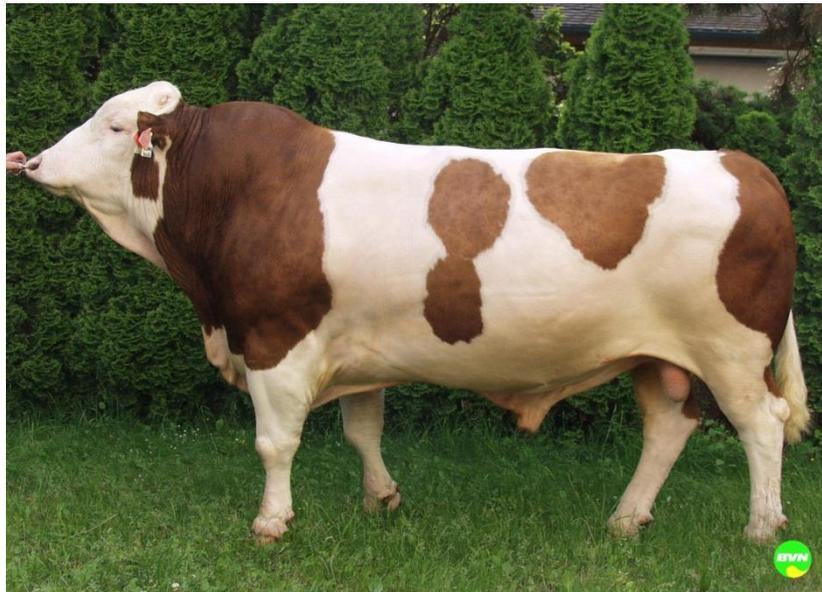


Abbildung 7: Fleckviehbulle Ralmesbach PS
(Quelle: Besamungsverein Neustadt an der Aisch)

2.2.2 Hornlosigkeit im Deutschen Fleckvieh

In Bayern begann man bereits im Jahr 1974 mit der gezielten Zucht einer hornlosen Fleckviehlinie. Den Beginn eines Zuchtprogramms, das durch die Bayerische Landesanstalt für Tierzucht ins Leben gerufen wurde, bildeten Zukäufe von Fleckviehtieren mit Spontanmutation. Auf staatlicher Seite wurde großer Wert daraufgelegt, keine Tiere fremder Blutlinien einzukreuzen, um das gewünschte Hornlosigen in die Population zu bringen. Bei privaten Züchtern kam es in den 1970er Jahren aber hin und wieder zu Einkreuzungen von Angus Tieren (LAMMINGER, 1999). In jüngerer Vergan-

genheit wurden von Milchviehaltern auch hornlose Red Holstein Rinder zur Zucht eingesetzt. Begonnen hatte die Hornloszucht jedoch in der Fleischlinie des Deutschen Fleckviehs. Erst ab 1990, als man die Hornlosgenetik auch in die Milchviehherde der staatlichen Versuchsstation Grub einführte, begann schließlich die Zucht eines hornlosen Doppelnutzungsringes für die Milchviehhaltung. Einer der ersten herausragenden Bullen war der aus dem staatlichen Zuchtbetrieb Almesbach stammende Ralmesbach PS (Abb. 7). Der 2001 geborene Bulle war 2007 mit einem GZW von 130 und einem Milchwert von 127 der bis dahin leistungsstärkste hornlose KB-Bulle in der Doppelnutzung. Um das Zuchtprogramm weiter voranzutreiben, begann 2003 die Erfassung von genetisch hornlosen Rindern durch das Landeskuratorium für Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. (LKV Bayern). Hornlose Tiere wurden ab diesem Zeitpunkt mit den in Tabelle 1 aufgeführten Kürzeln als Namenszusatz versehen. Die Nachfrage und der Wert hornloser Bullen der Doppelnutzung sind in den letzten Jahren dank der verbesserten Milchleistung stark gestiegen. Im Jahr 2014 konnte der zu diesem Zeitpunkt zuchtwertstärkste homozygot hornlose Bulle Incredible PP für einen Preis von 131 000 € als bisher teuerster Bulle in die Zuchtgeschichte eingehen (BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2016). Zwei Jahre später, im Jahr 2016 wurden in Bayern 76 268 natürlich hornlose Fleckviehkälber registriert. Die Gesamtzahl der bayerischen Fleckviehkälber war, abzüglich der Verluste in den ersten Lebenswochen, bei 813 502 Tieren. Demnach lag der Anteil von natürlich hornlos geborenen Kälbern bei rund 9 % (BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2017; LANDESKURATORIUM DER ERZEUGERRINGE FÜR TIERISCHE VEREDELUNG IN BAYERN E.V., 2017). Prognosen zufolge wird sich dieser Anteil durch exponentielles Wachstum im Jahr 2021 bereits auf rund 33 % steigern (GÖTZ et al., 2015). Diese Tendenz lässt sich auch an den Top 10 der meistgenutzten Fleckviehbullen des Jahres 2016 ablesen. Immerhin drei dieser Bullen sind genetisch hornlos (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E.V., 2017).

Tabelle 1: Hornloskürzel beim Doppelnutzungs-Fleckvieh (nach ROBEIS und LUNTZ, 2017)

Hornloskürzel	Bedeutung
P	Phänotyp hornlos
PP	homozygot hornlos
Pp	heterozygot hornlos
PS	heterozygot hornlos mit Wackelhornausprägung
pp	gehört
* (PP*/Pp*/P*S/pp*)	mit vorhandenem Hornlostestergebnis

2.2.3 Verzögertes Hornwachstum beim Deutschen Fleckvieh

Ein sporadisch beobachtetes Phänomen beim Deutschen Fleckvieh stellt das verzögerte Hornwachstum dar. Es handelt sich dabei um Tiere, die von gehörnten Eltern abstammen, bei denen das Hornwachstum jedoch sehr zeitverzögert einsetzt. So scheinen die Tiere zwar als Kälber hornlos zu sein, bilden jedoch verspätet noch feste oder wackelnde Hornansätze unterschiedlicher Größe nach. Da einige Bullen Väter mehrerer Kälber mit dieser Besonderheit sind, geht man von einem genetischen Hintergrund aus (ROBEIS & LUNTZ, 2013).

2.3 Kartierung von Genen

2.3.1 Genkarten

Genkarten beschreiben die Position von Genen im Genom. Es werden zwei Arten von Karten unterschieden, zum einen die physikalische, zum anderen die genetische Genkarte.

In physikalischen Genkarten können die Abstände von Genen auf zweierlei Weise angegeben werden. Entweder durch ihre Lage in Bezug zu den

durch Färbung sichtbar gemachten Chromosomenbändern, oder noch exakter in Basenpaaren (Einheit: bp = *base pairs*).

Genetische Karten geben die Abstände zwischen Genen anhand ihrer Rekombinationshäufigkeit an. Das bedeutet, es wird die Wahrscheinlichkeit eines Crossing-over Ereignisses zwischen den beiden Genen während einer Meiose ermittelt und daraus auf ihren Abstand geschlossen (GELDERMANN, 2005). Je näher zwei Gene auf einem Chromosom beieinanderliegen, desto seltener kommt es beim Crossing-over zu einer Rekombination. Die Einheit für genetische Karten wurde nach dem amerikanischen Genetiker Thomas Hunt Morgan (1866–1945) Centimorgan (cM) genannt. Dabei entspricht 1 Centimorgan einer Rekombinationshäufigkeit von 1 %. Niedrige Rekombinationshäufigkeiten deuten demnach auf geringen Abstand zwischen zwei Genen hin, während bei hohen Rekombinationshäufigkeiten die Gene weit auseinander liegen (GRAW, 2015).

Eine näherungsweise Umrechnung der genetischen Einheit Centimorgan in die physikalische Einheit *base pairs* ist möglich. Allerdings ist zu beachten, dass Rekombinationshäufigkeiten und damit auch Umrechnungsfaktoren stark variieren. Beeinflusst werden sie durch Art, Geschlecht, Genombereich und das Individuum selbst (NACHMAN, 2002). Für das Rind wird zum Beispiel ein genomweiter Wert von 1,25 Mb/cM angegeben, was 1 250 000 Basenpaaren pro Centimorgan entspricht (ARIAS et al., 2009). Weiterhin findet man auch geschlechtsbezogene Angaben von 0,986 Mb/cM für Bullen und 1,085 Mb/cM für Kühe (MA et al., 2015).

2.3.2 Vom Merkmal zum beeinflussenden Gen

Merkmale lassen sich als qualitativ oder quantitativ beschreiben. Ein qualitatives Merkmal stellt zum Beispiel die Fellfarbe (LUSH, 1949) oder die Hornlosigkeit (SEICHTER et al., 2012) eines Tieres dar. Quantitative Merkmale folgen dagegen meist einer kontinuierlichen Verteilung, Beispiele sind Gewicht und Größe. Viele quantitative Merkmale haben im Vergleich zu qualitativen Merkmalen bei Nutztieren eine noch größere wirtschaftliche

Bedeutung. Dazu gehören unter anderem Merkmale, die mit Wachstum, Milchproduktion oder Fleischqualität zu tun haben. Meist werden quantitative Merkmale von einer großen Anzahl von Genen und zusätzlich stark von der Umwelt beeinflusst (ANDERSSON, 2001). Eine Region im Genom, die ein oder mehrere merkmalsbeeinflussende Gene enthält, wird als *QTL* (*quantitative trait locus*) bezeichnet (GELDERMANN, 1975). Um *QTLs* aufzufinden, setzt man Kartierungsstudien ein. Dabei ist der Ablauf einer Kartierungsstudie in der Regel in die Phänotypisierung, die Genotypisierung und die statistische Auswertung gegliedert. Mit der Identifikation eines *QTL* ist das Ziel, ein kausales Gen oder eine kausale Mutation zu finden, in der Regel noch nicht erreicht (ANDERSSON, 2001). Um die molekulare Basis eines *QTL* aufzuklären, bedarf es meist weiterer Studien, die als Feinkartierung bezeichnet werden (FLINT & MOTT, 2001).

2.3.3 *SNPs* (single nucleotide polymorphisms) als genetische Marker

Eine der Grundlagen für oben genannte Kartierungsstudien sind genetische Marker. Aufgrund ihrer besonderen Wichtigkeit für die in dieser Studie eingesetzten Methoden soll hier nur auf Einzelbasenpolymorphismen, kurz *SNPs* (*single nucleotide polymorphisms*), eingegangen werden. Ein *SNP* (sprich: Snip) ist eine bestimmte Stelle im Genom, an der anstelle des Referenzallels verschiedene Nukleinbasen auftreten können. Obwohl theoretisch das Vorkommen aller vier Nukleinbasen möglich ist, besitzen *SNPs* fast ausschließlich nur zwei Varianten. Daher werden sie häufig auch als biallelisch bezeichnet (FROMMLET et al., 2016). Diese Eigenschaft ist durch ihre Entstehung aus Punktmutationen bedingt. So ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens zweier unabhängiger Mutationen an der gleichen Stelle extrem gering. Man unterscheidet zwei Formen des Basenaustauschs. Zum einen die Transition, die einen Austausch zwischen Purinbasen (Adenin, Guanin) oder einen Austausch zwischen Pyrimidinbasen (Cytosin, Thymin) bedeutet und zwei Drittel aller *SNPs* ausmacht. Zum anderen die Transversion, bei der ein Austausch zwischen Purin- und Pyrimidinbase erfolgt (VIGNAL et al., 2002). *SNPs* liegen sowohl in codierenden als auch in nicht-codierenden DNA-Abschnitten. Dabei können sie nahe einer

gesuchten genetischen Veränderung lokalisiert sein, an dieser teilhaben oder selbst die Mutation sein. *SNPs* in codierenden Abschnitten sind entweder synonyme oder nicht-synonyme Natur. Synonyme *SNPs* haben durch die redundante Eigenschaft des genetischen Codes trotz Basenaustausch keinen Aminosäureaustausch zur Folge. Damit bleibt die Primärstruktur des entsprechenden Proteins dieselbe. Dennoch können auch synonyme Mutationen funktionelle Auswirkungen haben, da zum Beispiel nicht für jedes Basentriplett gleich große Mengen an tRNA bereitstehen. Folglich kann es zu Abweichungen in der Menge eines synthetisierten Proteins kommen (GRAW, 2015).

Das Rindergenom mit seinen rund 3 Billionen Basenpaaren enthält hunderte von *SNPs*. Mit Hilfe eines so genannten Chips lässt sich ein Teil von ihnen schnell und vergleichsweise kostengünstig abrufen (MATUKUMALLI et al., 2009). *SNP*-Chips für Rinder werden von verschiedenen Anbietern hergestellt und können zwischen 2900 und 777 962 *SNPs* eines Tieres gleichzeitig abfragen (NICOLAZZI et al., 2014). Der in dieser Arbeit für die Genotypisierung gesammelter Proben verwendete Chip umfasst 54 609 *SNPs* und wird in Kapitel 3.2.7 näher beschrieben.

Die Möglichkeit, *SNPs* im Hochdurchsatzverfahren analysieren zu können, stellte nicht nur einen Meilenstein für alle Arten von Kartierungsstudien dar, sondern begründete auch die heute in der Rinderzucht routinemäßig durchgeführte genomische Selektion. Der Begriff genomische Selektion bezeichnet dabei die Nutzung einer Prognose über die voraussichtlichen Zuchtwerte eines Tieres anstelle der klassischen Nachkommenprüfung. Diese Prognose kann anhand des aus *SNPs* bestehenden Genotyps abgeleitet werden. Der Vorteil im Vergleich zu herkömmlichen Zuchtwertschätzungen ist die Anwendbarkeit bei jungen Tieren, von denen noch keine Kenntnis über eigene und Nachkommenleistungen besteht (FRIES & PAUSCH, 2011).

2.3.4 Kartierungsmethoden

2.3.4.1 Kopplungskartierung

Als Kopplung (engl. *linkage*) wird die räumliche Nähe zweier Gene auf einem Chromosom bezeichnet, die ihre Trennung bei der Rekombination während der Meiose im Regelfall verhindert. Die beiden Gene werden somit zusammen, das heißt gekoppelt, vererbt (PULST, 1999). Man spricht von gekoppelten Genen, wenn diese in mindestens 50 % der Fälle während der Meiose nicht rekombinieren (BURTON et al., 2005).

Die Kopplungskartierung beruht auf dem Phänomen der Kopplung. Ursprünglich wurde sie von dem Genetiker Alfred Sturtevant, einem Schüler von Thomas H. Morgan, entwickelt. Sturtevant erkannte, dass sich mittels Rekombinationsraten die relativen Abstände von Genen zueinander ermitteln ließen und erstellte so im Jahr 1913 die erste Genkarte (GRIFFITHS, 2005).

Heute ist die Lokalisation vieler Gene in Form von genetischen Markern bekannt. Dieses Wissen kann genutzt werden, um ein unbekanntes Gen ausfindig zu machen. Befindet sich das gesuchte Gen in Kopplung mit einem genetischen Marker, kann man so auf seine ungefähre Position im Genom schließen (TERWILLIGER & GORING, 2009). Kopplungsanalysen versuchen deshalb, durch die Nachverfolgung einer Eigenschaft innerhalb von Stammbäumen eine Verbindung zwischen einem genetischen Marker und dem phänotypischen Merkmal herzustellen (TEARE & BARRETT, 2005). Bei Nutztieren wie dem Rind ist es möglich, Stammbäume mit großen Familien paternaler Halbgeschwister zusammenzustellen. Das macht den Einsatz der Methode in Nutztierpopulationen deutlich kraftvoller als beim Menschen (GODDARD & HAYES, 2009).

Am besten eignet sich die Kopplungskartierung für monogene Merkmale, denen ein klassischer Erbgang nach Mendel und damit meist nur ein einziges Gen zu Grunde liegt. Die Methode funktioniert aber auch bei allelischer Heterogenität (s. Kapitel 2.1.5). Schwieriger wird es hingegen bei Locusheterogenität, bei der das gleiche Merkmal durch Mutationen in unterschiedli-

chen Genen hervorgerufen werden kann. Zudem wird die Kraft der Methode erheblich reduziert, wenn eine Eigenschaft einem unvollständig penetranten Erbgang zuzuordnen ist. Unvollständige Penetranz beschreibt die Möglichkeit, dass trotz vorhandener genetischer Grundlage ein Merkmal von manchen Individuen nicht ausgeprägt wird. Die Ursache hierfür kann in Umwelteinflüssen oder in kompensierenden Genen gesucht werden. Weiterhin sind gleiche Phänotypen, die durch Umwelteffekte verursacht werden als problematisch zu nennen. Sie werden als Phänokopien bezeichnet und verursachen einen verringerten Erfolg der Methode (TEARE & SANTIBAÑEZ KOREF, 2014).

Durch die Kopplungskartierung lässt sich ein gesuchtes Gen häufig nur innerhalb eines sehr großen Bereichs von mehreren Megabasen kartieren. In diesem Bereich finden sich dementsprechend viele mögliche Kandidatengene. In weiteren Schritten bedarf es daher Feinkartierungen bzw. Kandidatengenanalysen (CARLSON et al., 2004).

2.3.4.2 Kopplungsungleichgewichts-Kartierung

Kopplungsungleichgewicht (engl. *linkage disequilibrium*, LD) ist die Bezeichnung für eine Assoziation von Allelen an zwei oder mehr Genorten, die nicht zufällig auftritt (SLATKIN, 2008).

Kopplungsungleichgewichts-Kartierungen haben dasselbe Ziel wie Kopplungskartierungen. Sie werden verwendet, um die relativen Positionen zweier Genorte zueinander zu ermitteln und um Genorte unbekannter Lage mithilfe von genetischen Markern aufzufinden. Der Unterschied zu Kopplungskartierungen besteht darin, dass sie das nicht durch die Zuhilfenahme bekannter Stammbäume tun. Kopplungsungleichgewichts-Kartierungen nützen stattdessen historische Rekombinationen bzw. Informationen gemeinsamer Vorfahren aus der Population, deren Ursprung weiter zurückliegt als das bei wenigen Generationen innerhalb von Stammbäumen der Fall ist (TERWILLIGER & GORING, 2009).

Dabei wird normalerweise von einer in der Vergangenheit entstandenen Mutation ausgegangen, die umgeben von flankierenden Genen auf einem Chromosomenabschnitt vorlag. Im Laufe der Zeit wird dieser Chromosomenabschnitt durch Rekombination verändert. Aber selbst viele Generationen später finden sich noch unterschiedlich große Teile des ursprünglichen Chromosomenabschnitts, die mit der Mutation gemeinsam vererbt werden. Diese Überreste des ursprünglichen Chromosomenabschnitts befinden sich mit der Mutation im Kopplungsungleichgewicht (KRUGLYAK, 1997). Sie werden aufgrund ihrer Herkunft aus einem gemeinsamen Vorfahren als herkunftsgleich (engl. *identical by descent*, IBD) bezeichnet. Neben dem Auftreten von Mutationen spielen für die Entstehung von Kopplungsungleichgewicht noch weitere evolutionäre Triebkräfte eine Rolle. Dazu zählen unter anderem Genfluss, Gendrift und Selektion (TERWILLIGER et al., 1998).

Kopplungsungleichgewicht kann, muss aber nicht, auf der Kopplung zweier Gene beruhen (SLATKIN, 2008). Beispielhaft für einen anderen Auslöser sei das Phänomen der Populationsstratifikation genannt. Durch sie kann es zur Assoziation zwischen einem Marker und einem gesuchten Phänotyp kommen, obwohl der Marker in keiner Weise mit dem ursächlichen Gen gekoppelt ist. Für diesen Fall wird der Begriff Scheinassoziation (engl. *spurious association*) gebraucht.

In der Praxis kann man sich eine Studie vorstellen, bei der ein krankheitsauslösendes Gen gefunden werden soll. Angenommen, ein Teil der untersuchten Individuen stammt aus einer Subpopulation, in der die Krankheit mit höherer Prävalenz auftritt als in der restlichen Population. Die Folge ist eine Verknüpfung jeglicher Allele, die mit höherer Frequenz in der Subpopulation auftreten, mit der Krankheit. Populationsstratifikation beschreibt demnach die unterschiedlich hohen Frequenzen von Allelen zwischen Subpopulationen in einer Gesamtpopulation (PRITCHARD & ROSENBERG, 1999).

Einen großen Vorteil der Kopplungsungleichgewichts-Kartierung stellt ihre hohe Kartierungsgenauigkeit dar. Dafür sorgen die große Anzahl historischer Rekombinationen und die leichtere Beschaffung von Probenmaterial, da keine Verwandtschaft zwischen den Individuen bestehen muss.

Kopplungsungleichgewichts-Kartierungen werden daher häufig zur Feinkartierung eingesetzt (COLLINS, 2009).

Die Begriffe Kopplungsungleichgewichts-Kartierung und Assoziationskartierung können synonym verwendet werden (MARCH, 1999). Für Studien, die das gesamte Genom einschließen und auf Kopplungsungleichgewicht beruhen, wird der Name genomweite Assoziationsstudie (engl. *genome-wide association study*, GWAS) verwendet (BUSH & MOORE, 2012).

2.3.4.3 Kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungskartierung

Eine Kombination aus Kopplungs- und Kopplungsungleichgewichts-Kartierung (engl. *combined linkage disequilibrium and linkage analysis*, *cLDLA*) nützt zum einen Informationen über aktuelle Rekombinationen innerhalb von Stammbäumen von zu untersuchenden Familienmitgliedern. Zum anderen werden Rekombinationen berücksichtigt, die bereits in früherer Vergangenheit stattgefunden haben (MEUWISSEN & GODDARD, 2000). Dadurch bringt die *cLDLA* die Vorteile beider Analysemethoden zusammen. Die Kopplungsanalyse, die nicht das Risiko falsch positiver Assoziationen aufgrund von Populationsstratifikation birgt, sorgt in der *cLDLA* für mehr Sicherheit bezüglich der erzielten Kartierungsergebnisse (ALMASY et al., 1999). Die Qualität der Kopplungsungleichgewichtskartierung liegt währenddessen in der höheren Kartierungsgenauigkeit (MEUWISSEN & GODDARD, 2000).

Für das Design einer *cLDLA* ist es generell günstiger, viele Familien mit einer geringeren Anzahl an Familienmitgliedern einzubeziehen, anstatt wenige große Familien zu verwenden. Dadurch lässt sich der Informationsge-

halt und somit die Kartierungsgenauigkeit deutlich steigern (LEE & VAN DER WERF, 2004).

Die *cLDLA* wurde häufig zur Feinkartierung eingesetzt. So zum Beispiel bei OLSEN et al. (2004; 2005), die diese Methode nutzten, um einen *QTL* für Milchinhaltstoffe auf *BTA6* feinzukartieren. Der in erster Instanz mittels Kopplungsanalyse identifizierte Bereich, auch als Konfidenzintervall bezeichnet, betrug ca. 16 cM (OLSEN et al., 2002). Unter anderem durch den Einsatz der *cLDLA* gelang es, das Konfidenzintervall zuerst auf 7,5 cM (OLSEN et al., 2004) und schließlich sogar auf ca. 0,5 cM (OLSEN et al., 2005) zu reduzieren. Die *cLDLA* ist aber nicht an eine vorab durchgeführte Kopplungsanalyse gebunden, sondern findet heutzutage meist direkten Einsatz. Als Beispiel einer direkten Anwendung sei die Kartierung der in Kapitel 2.1.5 beschriebenen Hornlosmutation im Yak genannt (MEDUGORAC et al., 2017).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Für die Kartierungsstudie über Wackelhörner wurden Tiere der Rasse Deutsches Fleckvieh aus bayerischen Fleckviehzuchtbetrieben, bayerischen Besamungsstationen und der Versuchsherde der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub phänotypisiert und beprobt. Der Arbeitsgruppe Populationsgenomik lag hierfür eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor (Genehmigungsnummer: 55.2-1-54-2532.3-24-12).

Alle gesammelten Tiere wurden auf Hornlosigkeit getestet, sofern nicht bereits ein Testergebnis vorhanden war. Eine Ausnahme bildeten Bullen, aus deren Nachkommen zweifelsfrei auf ihre eigene Hornlosmutation geschlossen werden konnte. Der Hornlostest diente als entscheidende Verifizierung des Phänotyps. Im Anschluss daran erfolgte die Erstellung der *SNP*-Genotypen ausgewählter Tiere. Für einen Teil der gesammelten Tiere waren diese durch die genomische Selektion bereits verfügbar.

Im Rahmen der Phänotypisierungen wurden Tiere mit wackelnden Hörnern ohne Hornlosallel gefunden. Daraus ergab sich die Frage, ob diese Tiere eine Form des verzögerten Hornwachstums oder Wackelhörner anderen Ursprungs aufwiesen. Zur Unterscheidung wurde ein eindeutiges Merkmal normal ausgebildeter Hörner im Vergleich zu Wackelhörnern herangezogen: die Pneumatisation. Diese beginnt wie in Kapitel 2.1.3 erläutert in einem Alter von etwa sechs Monaten. Über ihren zeitlichen Verlauf im Deutschen Fleckvieh gab es jedoch bisher noch keine Kenntnis. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Untersuchung zum Pneumatisationsverlauf der Hörner durchgeführt. Dabei wurde das Merkmal Pneumatisation vor allem auf seine Sicherheit als Unterscheidungskriterium für normale Hörner und Wackelhörner getestet. Die Proben für diese Untersuchung stammten von der Schlachthof-Betriebs-GmbH Fürth (s. Kapitel 3.1.1.5). Die Untersuchung der Hörner wurde dem zuständigen Veterinäramt der Stadt Fürth angezeigt und genehmigt.

3.1.1.1 Tiere aus bayerischen Fleckviehzuchtbetrieben

Insgesamt wurden in bayerischen Fleckviehzuchtbetrieben 549 Tiere beprobt und phänotypisiert. Davon waren 503 Tiere weiblich und 46 Tiere männlich. Der überwiegende Teil der Proben mit 516 Tieren wurde selbst gesammelt, wohingegen die restlichen 33 Proben aus Einsendungen von Fleckviehzüchtern stammten. Die selbst durchgeführten Probennahmen erfolgten in zwei Phasen und unterschieden sich bei der Dokumentation der Phänotypisierung. In Phase 2 bzw. ab August 2016 war diese deutlich detaillierter. Die Notwendigkeit zusätzliche Einzelheiten bei der Erhebung des Phänotyps einzubeziehen wurde erst im Laufe des Projekts ersichtlich.

3.1.1.1.1 Probennahme Fleckviehzuchtbetriebe Phase 1

Die erste Phase der Probennahme erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Besamungsverein Neustadt an der Aisch e.V. (BVN) zwischen Dezember 2014 und Januar 2015. In dieser Phase wurden 424 Tiere aus acht Fleckviehzuchtbetrieben in Bayern untersucht. Davon waren 401 Tiere weiblich und 23 Tiere männlich. Die Landwirte wurden gebeten, eine Vorauswahl an Tieren zu treffen, die aufgrund ihrer Stammbäume und ihrer Phänotypen genetisch hornlos sein könnten. Ausgewählte Tiere wurden an beiden Hornansatzstellen palpatorisch untersucht, um auf vorhandene Wackelhörner zu prüfen. Dabei wurden Tiere mit Kruste (ein- oder beidseitig) und Tiere mit Wackelhorn (ein- oder beidseitig) sowie Tiere mit einer Kombination aus Wackelhorn und Kruste als Wackelhorn-tragend dokumentiert. Alle anderen Tiere wurden als Wackelhorn-frei eingestuft. Die Beprobung erfolgte mittels EDTA-Blutentnahme aus der Schwanzvene.

In die Kartierungsstudie wurden aus dieser Probengruppe nur Tiere aufgenommen, bei denen eine detailliertere Nachprüfung des Phänotyps vorgenommen werden konnte.

3.1.1.1.2 Probennahme Fleckviehzuchtbetriebe Phase 2

Die zweite Probennahme erfolgte im September 2016. Es wurden 92 Tiere aus vier weiteren Fleckviehzuchtbetrieben in Bayern untersucht. Dabei entsprach die Geschlechterverteilung 85 weiblichen und sieben männlichen Tieren. Die Dokumentation der Phänotypen wurde mit Hilfe eines Fragebogens nach Vorlage von Dr. Aurélien Capitan verfeinert. Ursprünglich war dieser Fragebogen auf die Rasse Charolais ausgelegt. Nach einer Anpassung ans Fleckvieh wurde er in der modifizierten Form (Anhang 1) für alle 92 Tiere ausgefüllt. Des Weiteren entstanden je Tier eine fotografische Frontalaufnahme des Kopfes und weitere Detailaufnahmen der Hornansatzstellen. Zur Beprobung wurden Haarwurzeln aus der Schwanzquaste oder der Ohrmuschel entnommen.

3.1.1.1.3 Eingesendete Proben

Zur Erweiterung des Probenmaterials kamen über die gesamte Projektlaufzeit von zweieinhalb Jahren mehrere Einsendungen von Fleckviehzüchtern hinzu. Insgesamt wurden auf diesem Weg 33 Haarwurzelp Proben aus 12 verschiedenen Betrieben zur Verfügung gestellt. Die Erfassung der Phänotypen erfolgte telefonisch im Gespräch mit den Besitzern und durch die Übermittlung von Bildern der Hornansatzstellen.

In fünf Fällen wurden Tiere vorgestellt, deren Phänotyp nicht mit ihrem Genotyp übereinstimmte. Es handelte sich um hornlose oder Wackelhorntragende Kälber gehörnter Eltern. Die Besitzer solcher Tiere wurden in regelmäßigen Abständen von 3–4 Monaten telefonisch kontaktiert und zur Entwicklung des Phänotyps ihrer Tiere befragt.

3.1.1.2 Bullen aus bayerischen Besamungsstationen

Für eine detaillierte Phänotypisierung männlicher Tiere wurden im Zeitraum von August bis September 2016 die im Folgenden aufgeführten bayerischen Besamungsstationen besucht:

- Besamungsverein Neustadt an der Aisch e.V.
- Bayern Genetik GmbH (an den Standorten Grub und Landshut)
- Zweckverband II für künstliche Besamung der Haustiere in Greifenberg
- CRV Deutschland GmbH in Wasserburg am Inn
- Besamungsverein Nordschwaben e.V. in Höchstädt

Der Phänotyp aller am Besuchstermin angetroffenen hetero- und homozygot hornlosen Fleckviehbullen dieser Stationen wurde mit Hilfe des bereits erwähnten Fragebogens (Anhang 1) dokumentiert. Weiterhin wurden Fotografien des Kopfes und der Hornansatzstellen angefertigt.

Unter den insgesamt 115 phänotypisierten Bullen waren 24 homozygot hornlose Bullen, von denen fünf Tiere der Fleischlinie angehören, und 91 heterozygot hornlose Bullen, von denen ein Tier der Fleischlinie zuzuordnen ist.

Zu weiteren Untersuchungszwecken stellten die Besamungsstationen Sperma der Bullen zur Verfügung.

3.1.1.3 Kühe aus der Versuchsherde der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Grub

In Kooperation mit der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) wurden im Januar 2017 47 hetero- und homozygot hornlose Kühe der Versuchsherde in Grub anhand des Fragebogens zur Hornstatushebung (Anhang 1) phänotypisiert. Von allen Tieren entstanden Kopfportraits und Detailaufnahmen der Hornansatzstellen. Weiterhin wurden Haarwurzelproben aus der Schwanzquaste eines jeden Tieres gewonnen.

3.1.1.4 Tiere vom Kälbermarkt in Ansbach

Zusammen mit dem Besamungsverein Neustadt an der Aisch e.V. (BVN) wurden zwischen Januar und März 2016 fünf Kälbermärkte für Zucht- und Mastkälber der mittelfränkischen Stadt Ansbach besucht. Dabei wurden ausschließlich Fleckviehkälber homozygot hornloser Bullen phänotypisiert und mittels einer Haarwurzelprobe aus der Schwanzquaste beprobt. Durch die homozygot hornlosen Väter war das Vorhandensein von mindestens einem Hornlosallel in den untersuchten Nachkommen garantiert.

Die Besuche der Kälbermärkte waren nicht ausschließlich zur Probengewinnung bestimmt. Sie dienten überdies der Beobachtung früher Entwicklungsstadien von Wackelhörnern. Die insgesamt 182 phänotypisierten und beprobten Kälber teilten sich in 168 männliche Tiere und 14 weibliche Tiere. Das Alter der Kälber betrug zwischen vier und zehn Wochen.

3.1.1.5 Tiere vom Schlachthof in Fürth

Um einen Überblick über den Verlauf der Pneumatisation im Fleckviehhorn zu gewinnen, wurden 93 Hornpaare von Fleckviehtieren aus Bayern und Baden-Württemberg mittels Röntgenaufnahme untersucht. Die Hornpaare wurden in der Zeit von Oktober 2015 bis März 2016 von der Schlachthof-Betriebs-GmbH Fürth durch den zuständigen amtlichen Tierarzt, Herrn Timo Baumann, zur Verfügung gestellt. Um Alter und Identität eines Tieres erfassen zu können, war jedes Hornpaar gemeinsam mit einer Ohrmarke verpackt. Zum Zeitpunkt der Schlachtung waren die Rinder zwischen einem und viereinhalb Jahren alt (Tab. 2). Aus den Hornpaaren wurden bei der Arbeitsgruppe für Populationsgenomik Gewebeproben entnommen, um in fraglichen Fällen einen Hornlostest durchführen zu können. Außerdem wurden Fotografien von der Längsansicht der Hornpaare und der Aufsicht auf die Schnittflächen angefertigt. Zuletzt erfolgte die Erstellung der Röntgenaufnahmen in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München. Im Anschluss daran wurden die Hornpaare an die Tierkörperbeseitigungsanlage Kraftsried zur Entsorgung abgegeben.

Tabelle 2: Probenmaterial zur Pneumatisation von Fleckviehhörnern

Alter in Jahren	Tiere männlich	Tiere weiblich
1–1,5	4	2
>1,5–2	17	18
>2–2,5	14	13
>2,5–3	8	8
>3–3,5	1	3
>3,5–4	0	4
>4–4,5	0	1

3.1.2 Datenmaterial

3.1.2.1 *SNP*-Genotypen aus Deutschland

In der Kartierungsstudie fanden insgesamt 156 *SNP*-Genotypen, die von der Arbeitsgemeinschaft Süddeutscher Rinderzüchter und Besamungsorganisationen e.V. (ASR) und vom Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. (LKV Bayern) zur Verfügung gestellt wurden, Verwendung. Die *SNP*-Genotypen stammten von 134 Fleckviehbullen und 22 Fleckviehkühen. Unter ihnen waren 113 Genotypen von Tieren, die im Rahmen dieser Studie eigenhändig phänotypisiert werden konnten. Für die übrigen 43 Tiere wurde als Informationsquelle über den Phänotyp das hinter dem Namen eines Tieres vermerkte Hornloskürzel in Kombination mit Bildern und Auskünften der Besitzer genutzt. Zur Sicherheit wurden auf diese Art und Weise ausschließlich Tiere mit Wackelhörnern phänotypisiert. Wackelhorn-freie Tiere ließen sich über das zur Verfügung stehende Bildmaterial in der Regel nicht ausreichend sicher identifizieren. Um eine zufriedenstellende Aussage treffen zu können, hätten speziell dafür qualitativ hochwertige Bilder der ausrasierten Hornansatzstellen angefertigt werden müssen. Anderenfalls können Krusten und sogar kleine Wackelhörner leicht unter dem Fell eines Tieres versteckt bleiben.

3.1.2.2 *SNP*-Genotypen aus der Schweiz

Zur Vergrößerung des Studienmaterials flossen in die Kartierungsstudie 63 *SNP*-Genotypen heterozygot hornloser Fleckviehtiere ein, die von Prof. Dr. Cord Drögemüller der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern zur Verfügung gestellt wurden. Darunter waren 14 männliche und 49 weibliche Tiere, die überwiegend in der Schweiz und zum geringeren Teil auch in Deutschland und Österreich beprobt worden waren. Für jedes dieser Tiere waren zudem ein Hornlostestergebnis und Informationen über dessen phänotypischen Hornstatus zugänglich. Das Tiermaterial wurde bereits in anderen Projekten verwendet (WIEDEMAR et al., 2014; TETENS et al., 2015).

3.1.3 Auswahl der Studientiere für die Kartierungen

Die Auswahl der Studientiere unterlag strengen Kriterien. Diese ergaben sich durch die im Verlauf der Studie immer deutlicher gewordenen komplexen Eigenschaften des Phänotyps.

Aufgrund der von WIEDEMAR et al. (2014). entdeckten Tatsache, dass ausschließlich Tiere mit nur einem Hornlosallel Wackelhörner ausbilden können, war für alle Studientiere ein Hornlostest mit Testergebnis „heterozygot hornlos“ zwingende Voraussetzung. Zusätzlich musste Kenntnis über die Art der Hornlosmutation (keltisch oder friesisch) bestehen. Bei einer geringen Anzahl von Studientieren war ein detailliertes Testergebnis und damit die Art der Hornlosmutation nicht bekannt. In solchen Fällen konnte die Mutation mit Hilfe von Stammbäumen mit großer Sicherheit abgeschätzt werden.

Im Laufe der Studienzeit veränderte sich die Sichtweise auf das Merkmal Wackelhörner. Es stellte sich heraus, dass eine Dokumentation der Wackelhorngröße für eine Kartierung von Nutzen sein kann. Wackelhorntragende Tiere wurden dementsprechend nur mit einer vorhandenen Angabe zur Größe ihrer Wackelhörner in die Kartierungen aufgenommen.

Weiterhin war das Alter eines Tieres zum Zeitpunkt der Phänotyperhebung von besonderer Bedeutung. Da Wackelhörner auch noch von adulten Tie-

ren ausgebildet werden können (LANGE, 1989; LAMMINGER, 1999), besteht bei Wackelhorn-freien Tieren, jüngeren Alters die Gefahr der nachträglichen Wackelhornentwicklung und damit der Zuordnung zur falschen Phänotypgruppe. In der Folge wurde für Wackelhorn-freie Tiere ein Mindestalter von eineinhalb Jahren zum Zeitpunkt der Phänotypisierung bestimmt.

Zudem wurde beabsichtigt Tiere mit großen Stirnbeulen von der Studie ausschließen. Denn es gab nach wie vor keine Kenntnis darüber, inwieweit Stirnbeulen als eine Vorstufe zur Wackelhornentwicklung betrachtet werden müssen. Für weibliche Tiere ließ sich das Vorhaben umsetzen, indem Tiere mit großen Stirnbeulen (> 2 cm) nicht in der Studie verwendet wurden. Bei den männlichen Tieren konnte dieses Kriterium aufgrund eines Mangels an Wackelhorn-freien Tieren jedoch nicht berücksichtigt werden.

Zusammenfassend lassen sich die folgenden Kriterien festhalten:

- heterozygot hornlos
- Kenntnis über die Art der Hornlosmutation (keltisch/friesisch)
- Altersangabe zum Zeitpunkt der Phänotyperhebung
- Wackelhorn-tragende Tiere: Kenntnis über die Größe der Wackelhörner
- Wackelhorn-freie Tiere: Mindestalter bei der Phänotypisierung: 1,5 Jahre
- Wackelhorn-freie weibliche Tiere: Keine großen Stirnbeulen (> 2 cm)

Durch die Anwendung der genannten Punkte blieben aus den insgesamt 794 gesammelten heterozygot hornlosen Tieren für die Kartierungen 337 Tiere übrig. Eine Übersicht der Herkunft aller in der Kartierungsstudie verwendeten Tiere bietet Tabelle 3.

Für die Kartierungen wurden drei Tiersets erstellt. Tierset 1 enthält alle 337 ausgewählten, heterozygoten Tiere. In den beiden weiteren Tiersets wurden die 337 Tiere aus Tierset 1 ihrem Geschlecht entsprechend aufgeteilt. Tierset 2 beinhaltet 170 Bullen und in Tierset 3 finden sich 167 Kühe.

Tabelle 3: Proben- und Datenmaterial für die Kartierungsstudie

*Tiere, deren Phänotypen nicht im Probenmaterial erhoben wurden; () in den Gesamtwert einfließende Zahl

Herkunft von Phänotypen und Proben	Anzahl Phänotypen		Probenanzahl		Probenart	Pp Tiere		Studientiere	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich		männlich	weiblich	männlich	weiblich
Fleckviehzuchtbetriebe Phase 1	23	401	23	401	EDTA-Blut	17	266	2	24
Fleckviehzuchtbetriebe Phase 2	7	85	7	85	Haarwurzeln	7	76	5	52
Einsendungen Fleckviehzüchter	16	17	16	17	Haarwurzeln	10	7	6	4
Versuchsherde der LfL Grub	-	47	-	47	Haarwurzeln	-	42	-	38
Kälbermarkt Ansbach	168	14	168	14	Haarwurzeln	159	13	14	-
Bayerische Besamungsstationen	115	-	88	-	Sperma	91	-	86	-

Herkunft von Phänotypen und Daten	Anzahl Phänotypen		Datenart	Pp Tiere		Weitere Studientiere*	
	männlich	weiblich		männlich	weiblich	männlich	weiblich
Deutschland (ASR, LKV)	-	-	SNP-Genotypen	134 (43)	22 (-)	43	-
Schweiz (Prof. Drögemüller)	14	49	SNP-Genotypen	14	49	14	49

Gesamt (Proben- u. Datenmaterial)	343	613	302	564		341	453	170	167
--	------------	------------	------------	------------	--	------------	------------	------------	------------

3.1.4 Programme und Datenbanken

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme und Datenbanken sind zusammen mit ihrem Verwendungszweck in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Programme und Datenbanken

Programme und Datenbanken	Verwendungszweck und Quelle
Programme	
ASReml	Varianzkomponentenanalyse https://www.vsni.co.uk/software/asreml
Beagle 3.0.4.	Haplotypisierung und Marker-Imputation http://faculty.washington.edu/browning/beagle/b3.html
GCTA 1.24	Durchführung genomweiter Assoziationsstudien http://cnsgenomics.com/software/gcta/
GIMP 2.8	Bildbearbeitung https://www.gimp.org/
Microsoft SQL-Server 2014	Verwaltung von Geno- und Phänotypen in der hauseigenen Datenbank, Vorbereitung von Daten für Analysen https://msdn.microsoft.com/library/mt590198.aspx
Microsoft Visual Studio 2010	Erstellung von Anwendungsprogrammen für Datenvorbereitung, -analyse und -darstellung https://www.visualstudio.com/
PLINK 1.07	Datenvorbereitung für das Programm GCTA http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/
R 3.1.2	Datenvorbereitung https://www.r-project.org/
Datenbanken	
Bayerisches Behördennetzwerk (LKV)	Pedigreeinformationen beprobter Tiere <i>Zugangsberechtigung der Arbeitsgruppe Populationsgenomik</i>
Pubmed	Literaturrecherche https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
The Bovine Genome Database	Genkarte für das Rind http://www.bovinegenome.org
ZuchtData Rinderzucht Austria	Pedigreeinformationen von Fleckviehbulen http://cgi.zar.at/cgi-bin/zw_default.pl

3.1.5 Geräte

In Tabelle 5 finden sich alle Geräte, die zur Probenentnahme, DNA-Präparation und der Erstellung der Röntgenbilder der Hörner genutzt wurden.

Tabelle 5: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Thermo Fisher Scientific
Feinwaage	Sartorius
Fuji IP Cassette type C (35.4 x 43.0 cm)	Fujifilm
Gefrierschrank	Bosch
Kühlschrank	Siemens
Magnetrührer	IKA-Werke
Maßband	Prym
NanoDrop Spectrophotometer ND-100	preqlab
pH-Meter	Hanna Instruments
Pipetten	Abimed, Gilson, Rainin
Präparierschere	Bayer
Röntgenröhre Opitop150/40/80HC	Siemens
Skalpellhalter	Bayha
Spitzzange, abgewinkelt	Silberspeer
Thermomixer	Bachofer
Vortexer	Bachofer
Wärmeschrank	Bachofer
Zentrifuge	Hettich

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6 zeigt die benötigten Verbrauchsmaterialien für die Probenentnahme und die DNA- Präparation.

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
EDTA-Monovetten (9 ml)	Sarstedt
Einmalhandschuhe	Unigloves
Einmalkanülen (1,6 × 25 mm)	Braun
Etiketten	Delektron
Pinzette, anatomisch	Roth
Pipettenspitzen	Biozym
Reaktionsgefäß (1,5 und 2 ml)	Biozym
Reaktionsgefäß (15 ml)	Nunc
Skalpellsklingen (Fig. 21)	Schreiber

3.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Für die DNA-Präparation aus Blut, Haarwurzeln, Gewebe und Sperma wurden die Chemikalien und Reagenzien in Tabelle 7 verwendet.

Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
EDTA	Roth
Ethanol (ETOH)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl_2)	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	ICN Biomedicals
Proteinase K	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth

3.1.8 Puffer

Für die Herstellung von Lysat aus Haar- und Gewebeproben, sowie die Präparation von DNA aus Sperma wurden vier Puffer hergestellt und verwendet:

Extraktionspuffer

2,5 ml	2 M NaCl
5,0 ml	100 mM Tris pH 8,2
5,0 ml	20 mM EDTA pH 8,0
5,0 ml	10%iges SDS
ad 50 ml	Aqua dest.

PBS-Puffer

8,0 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,44 g	Na ₂ HPO ₄
0,24 g	KH ₂ PO ₄
ad 1 l	Aqua dest.

(wird auf pH 7,4 eingestellt)

Lysispuffer K

8,0 ml	1 M Tris-HCl pH 8,3
0,3 ml	2 M MgCl ₂
10,0 ml	1 M KCl
2,0 ml	Tween 20
ad 400 ml	Aqua dest.

TE-Puffer

10,0 ml	1 M Tris pH 8,0
2,0 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad 1000	Aqua bidest. ml

3.2 Methoden

3.2.1 Erhebung der Phänotypen

Bei der Erhebung der Phänotypen wurden beide Hornansatzstellen eines Tieres betrachtet und wenn nötig manuell palpiert. Aufgrund des Vorkommens von sehr kleinen, etwa fingernagelgroßen Krusten mussten in einigen Fällen die umliegenden Haare ausgeschoren werden. Um eine genaue Untersuchung durchführen zu können, war eine gute Fixation der Tiere besonders wichtig. Kühe wurden mithilfe des Fressgitters fixiert. Kälber wurden nach Möglichkeit durch eine zweite Person festgehalten. Bei Bullen bedurfte es aus Sicherheitsgründen zwingend einer Hilfsperson, die den Kopf des Tieres fachgerecht fixierte.

Zu Beginn des Projekts beschränkte sich die Dokumentation des Phänotyps auf eine der drei Eigenschaften „gehört“, „Wackelhorn-tragend“ oder „Wackelhorn-frei“. Im Laufe der Zeit waren jedoch die Vorteile einer deutlich detaillierteren Dokumentation zu erkennen. Gründe dafür waren die Feststellung einer unerwarteten Bandbreite an Phänotypen sowie die Erkenntnis, dass es sich bei Wackelhörnern um ein deutlich komplexeres Merkmal handelt als zunächst angenommen. Daraufhin wurden Wackelhörner mittels Maßband in der Länge vermessen und die Größe von Stirnbeulen und kleineren knöchernen Erhebungen geschätzt. Zudem wurde bei Wackelhörnern der Grad der Verschiebbarkeit beurteilt. Weiterhin erfolgte eine Betrachtung der Zwischenhornlinie und der Stirnnaht. Letzteres wurde durchgeführt, um auf das Vorkommen eines möglicherweise ähnlichen Syndroms wie dem im Charolais entdeckten T2SS zu prüfen. In Anbetracht eventueller Folgestudien wurden zusätzlich Auffälligkeiten der Augen dokumentiert. Die genannten Punkte wurden anhand eines Fragebogens (Anhang 1) erfasst. Abschließend wurden Fotografien vom Kopf in Frontalansicht und den Hornansatzstellen im Detail angefertigt.

3.2.2 Probenentnahme

EDTA-Blut wurde aus der Schwanzvene (*V. coccygea*) der Rinder entnommen. Dazu wurden eine 1,6 × 25 mm Kanüle und eine 9 ml fassende Monovette verwendet. Bei Verschmutzung der Einstichstelle zwischen dem 5. und 7. Schwanzwirbelkörper wurde diese vorab gereinigt.

Haarwurzelp Proben wurden bei Kühen und Kälbern aus der Schwanzquaste entnommen. Bei Bullen wurde aus Sicherheitsgründen die Entnahme von Haaren aus den Ohrmuscheln bevorzugt. Die Entnahme erfolgte mittels abgewinkelter Spitzzange. Es wurde darauf geachtet, möglichst saubere und trockene Haare zu wählen. Insgesamt wurden pro Tier mindestens 50 Haare mit gut sichtbaren Haarwurzeln entnommen und in ein Plastiktütchen verpackt. Lange Haare wurden zuvor am wurzellosen Ende mit einer Schere eingekürzt.

Alle Proben wurden mit der Tieridentifikationsnummer beschriftet.

3.2.3 Herstellung von Lysat und Extraktion von DNA

Die Herstellung von Lysat und die Extraktion von DNA wurden im Labor der Arbeitsgruppe für Populationsgenomik des Veterinärwissenschaftlichen Departments der LMU München durchgeführt. Aus Proben von Tieren, die ausschließlich für einen Hornlostest vorgesehen waren, wurde, sofern möglich, Lysat angefertigt. Eine Ausnahme bildeten Spermaproben, aus denen immer direkt DNA isoliert wurde. Weiterhin erfolgte eine direkte DNA-Präparation bei allen Tieren, bei denen nach Abklärung des genetischen Hornstatus die Möglichkeit zur Genotypisierung bestand.

3.2.3.1 Herstellung von Lysat aus Haar- und Gewebeproben

Zur Herstellung von Lysat aus Haarproben wurden zuerst die Wurzeln mit einer Schere vom restlichen Haar getrennt. Je nach Beschaffenheit der Haare wurden mehr oder weniger Haarwurzeln benötigt. Bei dickeren Haa-

ren genügte meist etwa zehn, während bei feineren Haaren zwischen 20 und 30 Haarwurzeln verwendet wurden. Die abgetrennten Wurzeln wurden in ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß gegeben und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde 0,5 µl Proteinase K und 99,6 µl Lysispuffer K zur Probe hinzugegeben. Danach wurde das Reaktionsgemisch 80 Minuten im Thermomixer bei 66 °C inkubiert und nachfolgend 20 Minuten bei 96 °C abgekocht. Letzteres geschah zur Deaktivierung der Proteinase K. Abschließend wurde die Probe für eine Minute bei 15000 × g zentrifugiert. Das fertige Lysat wurde im Kühlschrank gelagert.

Mit Gewebeproben wurde im Wesentlichen gleich verfahren. Anstelle der Haarwurzeln wurde ein ca. 10 mg großes Stück mittels Skalpell aus dem Gewebe entnommen, in sehr kleine Stücke geschnitten und ins Reaktionsgefäß verbracht.

3.2.3.2 DNA-Gewinnung aus Blut und Haarwurzeln

Für die DNA-Präparation aus EDTA-Blut und aus Haarwurzeln wurden die kommerziell erhältlichen QIAamp DNA Micro Kits der Firma QIAGEN verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den mitgelieferten Protokollen zur DNA-Extraktion. Diese sind im QIAamp DNA Micro Handbook nachzulesen (QIAGEN, 2014).

3.2.3.3 DNA-Gewinnung aus Sperma

Zu Beginn wurde ein 2,0 ml fassendes Mikroreaktionsgefäß mit 1,5 ml PBS-Puffer vorbereitet. Dazu wurde der Inhalt einer Spermapaillette (etwa 200–300 µl Sperma) gegeben. Anschließend erfolgte das mehrmalige Waschen mittels PBS-Puffer und Durchmischen der Probe. War der Überstand klar, wurde eine fünfminütige Zentrifugation mit 5000 × g, bei der sich am Grund des Mikroreaktionsgefäßes ein Spermapellet bildete, durchgeführt. Der Probe wurden nun 0,9 ml Extraktionspuffer, 100 µl einer 0,5 M DTT Lösung und 50 µl Proteinase K mit einer Konzentration von 20 mg/ml zugegeben.

Danach wurde sie bei 65 °C über Nacht in den Wärmeschrank gestellt. In dieser Zeit kam es zu einer Zerstörung der Zellmembranen und damit zu frei vorliegender DNA, die sich im Überstand befand. Weiterhin wurden der Probe 450 µl einer 6 M NaCl-Lösung hinzugefügt. Es folgten gründliches Vortexen und erneutes Zentrifugieren für 40 Minuten bei 5000 × g. Danach wurde der DNA enthaltende Überstand in ein 15,0 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 3 ml eiskaltem, 100% reinen Ethanol versetzt. Durch leichtes Schwenken des Reaktionsgefäßes kam es zum Ausfallen der DNA, die mit bloßem Auge als weißlicher Faden erkennbar wurde. Dieser Faden konnte mithilfe einer sauberen Pipettenspitze abgefischt und in ein 1,5 ml fassendes Mikroreaktionsgefäß, welches zuvor mit 100 µl TE-Puffer versehen wurde, verbracht werden. Zuletzt wurde die Probe zur Resuspendierung der DNA über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

3.2.4 Photometrische Messungen zur Qualität und Quantität der DNA

Nach der DNA-Präparation fand bei der Arbeitsgruppe für Populationsgenomik die Qualitätskontrolle und die Konzentrationseinstellung der DNA mithilfe von photometrischen Messungen statt. Für die erfolgreiche Durchführung einer *SNP*-Genotypisierung ist sowohl die Qualität als auch die Quantität einer vorliegenden DNA-Probe von entscheidender Bedeutung.

3.2.4.1 Qualität der DNA

Um die DNA auf Reinheit zu testen, wurden im UV-Spektrophotometer die optischen Dichten (OD) der Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Anschließend wurde der Quotient der beiden Messwerte berechnet. Der erste Messwert wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, ermittelt. Der zweite bei $\lambda = 280$ nm (OD_{280}), was dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht. Ergebnisse zwischen 1,7 und 1,9 deuten auf ausreichende Reinheit der vorliegenden DNA hin. Werte unter 1,7 sprechen dagegen für eine Ver-

unreinigung durch Proteine oder andere organische Substanzen. Werte über 1,9 können eine Verunreinigung durch RNA anzeigen.

3.2.4.2 Quantität der DNA

Die Konzentration der DNA wurde mittels UV-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von ca. 50 µg/ml. Diese Zahl stellte zugleich die gewünschte Konzentration für die Genotypisierung mittels *SNP*-Chip dar. Zu hohe DNA-Konzentrationen wurden durch Zugabe von destilliertem Wasser angeglichen. Bei zu niedrigen Konzentrationen musste die DNA-Isolierung wiederholt werden.

3.2.5 Hornlostest

Insgesamt wurden 923 Tiere auf Hornlosigkeit getestet. Die Durchführung der Hornlostests erfolgte bei der Tierzuchtforschung e.V. München in Grub.

Mit dem direkten Hornlostest kann nachgewiesen werden, ob ein Rind genetisch hornlos (hetero- oder homozygot) oder gehörnt ist. Zudem kann im Vergleich zum indirekten Hornlostest bestimmt werden, über welche Hornlosallele (P_C ; P_F) ein Tier verfügt. Der indirekte Hornlostest wurde im Jahr 2012 nach Aufklärung der molekularen Basis der Hornlosmutationen durch den direkten Test ersetzt (ROBEIS & LUNTZ, 2013).

Im ersten Schritt des Tests wird mittels zweier PCR-Ansätze ein Stück der Gensequenz an der Stelle des keltischen bzw. des friesischen Allels vervielfacht. Die *Primer* werden dabei so gewählt, dass sich zwischen dem PCR-Produkt des keltischen bzw. friesischen Allels und dem PCR-Produkt der jeweiligen Referenzsequenz unterschiedliche Längen ergeben. Beim keltischen Allel wird dazu ein DNA-Stück genutzt, das ein Abschnitt des Allels und der angrenzenden DNA-Sequenz überspannt und dessen Referenzsequenz mehr Basenpaare zwischen den *Primern* besitzt und folglich länger

ist. Um auf die Anwesenheit des friesischen Allels zu prüfen, wird von einer 2 bp langen Deletion innerhalb der friesischen Mutation (Duplikation) Gebrauch gemacht. Das PCR-Produkt von P_F ist demnach 2 bp kürzer als die Referenzsequenz. Für die Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer Länge wird eine Kapillarelektrophorese durchgeführt.

Im PCR-Produkt für den Nachweis des keltischen Allels kennzeichnet ein Vorhandensein von 169 bp langen DNA-Stücken dessen Anwesenheit. Sind ausschließlich 169 bp lange DNA-Fragmente nachweisbar, handelt es sich um die homozygote Form der Mutation (P_C/P_C). Werden zusätzlich 185 bp lange Stücke gefunden, charakterisiert dies die heterozygot vorhandene keltische Mutation (P_C/p). Werden hingegen nur 185 bp lange Stücke vorgefunden, ist kein keltisches Hornlosallel vorhanden.

Beim zweiten PCR-Produkt, das dem Nachweis des friesischen Allels dient, finden sich unabhängig von diesem immer DNA-Fragmente von 151 bp Länge. Ist ein friesisches Hornlosallel vorhanden, erscheinen zusätzlich DNA-Stücke von 149 bp Länge, die aus der oben genannten 2 bp langen Deletion innerhalb der Duplikation resultieren. Zur Unterscheidung der homo- und heterozygoten friesischen Allelkombination wird das Verhältnis zwischen den 149 bp Stücken und den 151 bp Stücken verglichen. Tiere, die das friesische Allel in homozygoter Form tragen, kennzeichnet ein Gleichgewicht von 151 und 149 bp langen DNA-Stücken (P_F/P_F). Bei heterozygoten Tieren (P_F/p) ist die Signalhöhe bei 151 bp nur halb so hoch wie die bei 149 bp.

Zur internen Qualitätssicherung laufen bei jeder Durchführung von Hornlostests zwei Referenzproben mit. Zum einen eine Positivkontrolle mit bekanntem Genotyp, zum anderen eine Negativkontrolle in Form einer Leerprobe (MEDUGORAC et al., 2012; ROTHAMMER et al., 2014; GENECONTROL GMBH, 2016).

3.2.6 Statistische Vergleiche zum Merkmal Wackelhorn

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz zwischen der Prävalenz und der Größe von Wackelhörnern in Bezug auf das Geschlecht bzw. die Art der Hornlosmutation, wurde der exakte Test nach Fisher ausgewählt. Dieser Test gilt als besonders gut für Stichproben mit geringerem Umfang geeignet. Zuerst werden die Häufigkeiten in einer Vierfeldertafel angeordnet und die Randsummen gebildet:

	Merkmal 1	Merkmal 2	Zeilensumme
Stichprobe 1	a	b	a+b
Stichprobe 2	c	d	c+d
Spaltensumme	a+c	b+d	n= a+b+c+d

Im Anschluss kann mit der folgenden Formel direkt der P-Wert ermittelt werden:

$$P = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!a!b!c!d!}$$

Aufgrund der zweiseitigen Fragestellung ist der errechnete P-Wert abschließend zu verdoppeln (WEIß, 2008).

Als Signifikanzniveau wurde ein P-Wert von 0,05 gewählt.

3.2.7 Genotypisierung mittels *SNP*-Chip

Die *SNP*-Genotypisierung von insgesamt 266 Tieren wurde mittels des BovineSNP50 v2 Bead Chip von Illumina bei der Tierzuchtforschung e.V. München in Grub durchgeführt. In der Kartierungsstudie fanden jedoch aufgrund nachträglich verschärfter Auswahlkriterien für Studientiere nur 112 *SNP*-Genotypen Verwendung. Der BovineSNP50 v2 Bead Chip erlaubt die gleichzeitige Genotypisierung von 24 Tieren für je 54 609 *SNPs*, die in

gleichmäßigen Abständen von ca. 49,4 kb über das gesamte Rindergenom verteilt liegen. Nicht alle abgefragten *SNPs* liefern eine korrekte Antwort. Das Maß für die Anzahl der fehlerfrei abgerufenen *SNPs* wird Call Rate genannt und beträgt bei diesem Chip durchschnittlich mehr als 99 %. Die Handhabung des Chips bietet unter anderem den Vorteil, dass eine Probe direkt, das heißt ohne vorherige Vervielfältigung der DNA durch eine PCR, verwendet werden kann (ILLUMINA INC., 2012).

Das Prinzip der Funktionsweise eines Chips lässt sich in vier Schritte einteilen. Der erste Schritt ist eine rund tausendfache Amplifikation des gesamten Genoms. Beim zweiten Schritt kommt es zur Hybridisierung der DNA an spezielle Oligonukleotid-Fängersonden, die auf kleinen Kügelchen, den Beads, sitzen. Für jeden *SNP* gibt es zwei unterschiedliche Bead-Typen, die sich ausschließlich an dem 3'-terminalen Ende ihrer Oligonukleotid-Fängersonden unterscheiden und damit die beiden Allele des entsprechenden *SNP* repräsentieren. Im dritten Schritt wird bei Übereinstimmung des 3'-Endes der Fängersonde mit der gefangenen Proben-DNA eine Strangverlängerung möglich. So können Biotin-markierte Desoxyribonukleosidtriphosphate angelagert werden, die im weiteren Verlauf eine Farbreaktion ermöglichen. Im vierten und letzten Schritt wird die Farbreaktion verstärkt, um die Ergebnisse besser auslesen zu können (GUNDERSON et al., 2005). Bei dem für die Genotypisierungen verwendeten Chip werden die beiden Allele eines *SNP* in zwei unterschiedlichen Farben dargestellt. Die Intensitätswerte beider Farben lassen sich anschließend per Scanner feststellen und entsprechen dem Verhältnis der Allele (ILLUMINA INC., 2011).

3.2.8 Qualitätskriterien für *SNPs*

Für den Abgleich von *SNP*-Positionen mit einem Referenzgenom wurde die *Bos taurus* UMD 3.1 Karte verwendet.

Weiterhin wurden für ein einheitliches Qualitätsniveau alle *SNPs* auf die folgenden Kriterien überprüft:

- Der *SNP* konnte bei über 5 % aller Tiere nicht erfolgreich genotypisiert werden.
- Durch den *SNP* entstanden häufig Probleme in Bezug auf die Abstammung mit verwandten Tieren.
- Der *SNP* war in der *Bos taurus* UMD 3.1 Karte nicht auffindbar.
- Die Häufigkeit der Ausprägung des selteneren Allels einen *SNP* (engl. *minor allele frequency*, MAF) lag unter 2,5 %.

War eines dieser Kriterien zutreffend, führte dies zum Ausschluss des betreffenden *SNP*.

Nach Anwendung dieser Qualitätskontrolle verblieben 49 916 *SNPs* im Markersset.

3.2.9 Haplotypisierung

Bei der Haplotypisierung werden die *SNP*-Marker eines genotypisierten Individuums ihrer genetischen Herkunft nach geordnet. Sie können entweder von dessen Vater oder dessen Mutter stammen. Der *SNP*-Genotyp wird so in einen paternalen und einen maternalen Haplotypen aufgeteilt. Ein Haplotyp ist dabei allgemein als die individuelle Anordnung von Nukleinbasen auf einem Chromosom definiert (FROMMLET et al., 2016).

Die Ableitung von Haplotypen aus den ungeordneten Genotypisierungsergebnissen ist für viele genetische Analysen essentiell. Für diese Aufgabe wurde das Programm BEAGLE in der Version 3.0.4 eingesetzt. BEAGLE schafft es mithilfe eines so genannten Hidden Markov Models (HMM), den wahrscheinlichsten Ursprungszustand von maternalen und paternalen Haplotypen wiederherzustellen (BROWNING & BROWNING, 2007).

Bei einem HMM wird angenommen, dass die beobachteten Daten – hier die ungeordneten Genotypen – aus einem unbeobachteten Markov-Prozess – hier die geordneten paternalen und maternalen Haplotypen – hervorgegangen sind. Dabei stellt ein Markov-Prozess die Wahrscheinlichkeit dar, mit

der ein Zustand in den nächsten Zustand übergeht, wobei stets vom aktuellen Zustand ausgegangen wird (BROWNING & BROWNING, 2011).

Im Programm BEAGLE wird das HMM nicht nur dafür genutzt, die *SNP*-Marker eines Genotypisierungsergebnisses nach mütterlicher und väterlicher Herkunft aufzuteilen, sondern es können sogar nicht typisierte *SNP*-Marker ergänzt werden. Diese Ergänzung wird als Imputation bezeichnet (BROWNING & BROWNING, 2009). Für die Imputation und die Haplotypisierung werden sowohl Daten verwandter als auch unverwandter Individuen genutzt (BROWNING & BROWNING, 2011).

In BEAGLE findet vor der Haplotypisierung eine Einteilung der Individuen bzw. Tiere in drei Gruppen statt. Die erste Gruppe besteht aus Trios, welche jeweils ein Tier mit dessen Eltern beinhalten. Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Duos, was einem Tier mit einem Elternteil entspricht. Die letzte Gruppe bilden die unverwandten Tiere (BROWNING & BROWNING, 2009). Unter den für die Kartierungsstudie verwendeten Tieren befanden sich 11 Trios, 227 Duos und 92 unverwandte Individuen.

Die Genauigkeit der rekonstruierten Haplotypen hängt von einer Reihe unterschiedlicher Faktoren ab. Dazu zählen die Stichprobengröße, die Markerdichte, die Richtigkeit der Genotypisierungsergebnisse, die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Individuen und die Zugehörigkeit zur gleichen Subpopulation.

In der Regel gilt, je größer die Stichprobenzahl, desto besser die Haplotypisierungsgenauigkeit. Daher ist es vorteilhaft, einen so genannten Referenzdatensatz einzusetzen (BROWNING & BROWNING, 2011). In der vorliegenden Studie wurden als Referenzdatensatz über die Studientiere hinaus insgesamt 9957 Rinder verschiedener Rassen eingesetzt.

3.2.10 Vorbereitung und Durchführung der kombinierten Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungskartierung (*cLDLA*)

Zur Vorbereitung der kombinierten Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungskartierung (*cLDLA*) wurden genomweit vereinheitlichte Verwandtschaftsbeziehungen (*unified additive relationships, UARs*) geschätzt. Anschließend erfolgte die Berechnung der *Locus IBD* Wahrscheinlichkeiten (*LocIBDs*) die in einer Diplotypen-Verwandtschaftsmatrix zusammengefasst wurden. Die genannten Berechnungen bildeten die Ausgangsbasis für die *cLDLA*, die einer Varianzkomponentenanalyse entspricht. Diese Varianzkomponentenanalyse wurde für drei Tiersets in je zwei Modellen und weiterhin je mit einem zusätzlichen fixen Effekt, der die Art der Hornlosmutation einbezog, durchgeführt. Daraus ergab sich eine Anzahl von 12 *cLDLAs*.

3.2.10.1 Korrektur von Verwandtschaftsbeziehungen mithilfe von genomweit vereinheitlichten Verwandtschaftsbeziehungen (*unified additive relationships, UARs*)

Bei Kartierungsstudien, die auf Kopplungsungleichgewicht ausgerichtet sind, besteht eine besondere Gefahr für falsch positive Ergebnisse. Diese Möglichkeit ergibt sich aus der in Kapitel 2.3.4.2 genannten Tatsache, dass Kopplungsungleichgewicht nicht zwangsläufig Kopplung bedeutet. Als Beispiel für Kopplungsungleichgewicht ohne Kopplung wurde die Populationsstratifikation erläutert. Ein weiteres Problem stellen unbekannte Verwandtschaftsbeziehungen dar.

Zwischen allen Tieren der Kartierungsstudie wurden darum genomweit vereinheitlichte Verwandtschaftsbeziehungen (*unified additive relationships, UARs*) geschätzt (POWELL et al., 2010) und in einer Matrix zusammengestellt. Diese beruhen auf so genannten *identity by descent (IBD)* Wahrscheinlichkeiten.

Identity by descent bedeutet Herkunftsgleichheit und meint, dass gleiche Allele zweier Individuen aufgrund gemeinsamer Vorfahren gleich sind. Bei

gleichen Allelen, die ohne gemeinsame Vorfahren auftreten, spricht man dagegen von *identity by state* (IBS) (POWELL et al., 2010).

Aus der *UAR*-Matrix wurde eine inverse Matrix gebildet, die in die Varianzkomponentenanalyse zur Korrektur der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Population einfließt.

3.2.10.2 Erstellung einer Diplotypen-Verwandtschaftsmatrix

Die Schätzung der *LocIBDs* wurde mithilfe des Verfahrens nach MEUWISSEN und GODDARD durchgeführt (MEUWISSEN et al., 2001). Dabei wurden zwischen den Haplotypenpaaren zweier Individuen die Wahrscheinlichkeiten ermittelt, nach denen ein unbeobachteter Locus an beliebiger Stelle herkunftsgleich, also IBD, ist. So entstanden bei je zwei vorhandenen Haplotypen eines Tieres pro Tierpaar insgesamt vier *LocIBD*-Matrizen.

Für die Ermittlung der *LocIBD*-Matrizen zwischen den Geschlechtschromosomen männlicher und weiblicher Tiere wurde im ersten Schritt das X-Chromosom in eine pseudoautosomale und eine nicht-pseudoautosomale Region unterteilt. Die pseudoautosomalen Regionen konnten nachfolgend äquivalent zu den Autosomen behandelt werden. Die bei Bullen aufgrund des Genotyp XY nur einfach vorkommende nicht-pseudoautosomale Region von Chromosom X wurde vergleichbar zu einer homozygot autosomalen Region behandelt.

Zur Bestimmung der IBD Wahrscheinlichkeiten wurden gleitende Fenster mit 40 *SNP*-Markern, die nach und nach alle Markerpositionen im Genom einnahmen, genutzt. Jeweils in der Fenstermitte, zwischen Marker 20 und 21, fand anhand der umliegenden *SNPs* die Schätzung der *LocIBD* statt. Im nächsten Schritt wurden die aus Haplotypen entstandenen *LocIBDs* in eine Diplotypen-Verwandtschaftsmatrix (*Diplotype Relationship Matrix* (D_{RM})) überführt. Als Diplotyp wird allgemein ein Haplotypenpaar homologer Chromosomen bezeichnet. Die Umrechnung der vier *LocIBDs* wurde mittels der Methode für additiv-genetische Verwandtschaftsbeziehungen nach LEE

und VAN DER WERF (2006) vorgenommen. Zunächst wurden dazu alle 4 *Loc/BDs* aufsummiert und das Ergebnis im Anschluss durch 2 geteilt.

3.2.10.3 *cLDLA* mittels Varianzkomponentenanalyse

Die kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungskartierung (*cLDLA*) wurde über eine Varianzkomponentenanalyse in Anlehnung an die Methode von MEUWISSEN et al. (2002) durchgeführt. Sie beinhaltet sowohl Kopplungsinformationen, die über die verwendeten Pedigreedaten bei der Haplotypisierung Eingang fanden, als auch Informationen über Kopplungsungleichgewicht, welche in der einfließenden Diplotypen-Verwandtschaftsmatrix vorhanden waren. Die Varianzkomponentenanalyse wurde genomweit, jeweils am Mittelpunkt eines jeden 40-*SNP* Gleitfensters, durchgeführt. An jeder dieser Stellen fand eine Schätzung über den Einfluss eines möglichen *QTL*, durch den das Merkmal Wackelhorn in der Studienpopulation bedingt ist, statt. Für die dazu nötigen Berechnungen wurde das Programm ASREML (GILMOUR et al., 2009) verwendet.

Die Varianzkomponentenanalyse beruhte auf folgendem gemischtem linearen Modell:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_1\mathbf{u} + \mathbf{Z}_2\mathbf{q} + \mathbf{e}$$

mit

\mathbf{y} = Vektor der beobachteten Phänotypen

$\boldsymbol{\beta}$ = Vektor der fixen Effekte

\mathbf{u} = Vektor der zufällig polygenen Effekte

\mathbf{q} = Vektor der zufällig additiv-genetischen Effekte

\mathbf{e} = Vektor der zufälligen Resteffekte

\mathbf{X} , \mathbf{Z}_1 , \mathbf{Z}_2 = Designmatrizen

Der Vektor \mathbf{y} stellte in den Kartierungen den Vektor des Hornstatus dar. Er wird in Kapitel 3.2.10.4 näher erläutert.

Im Vektor β sind die fixen Effekte zu Geschlecht und Alter (in Monaten) eines Tieres bei Feststellung des Phänotyps enthalten. In einem Teil der Kartierungen wurde zusätzlich die Art der Hornlosmutation als fixer Effekt verwendet. β enthält außerdem den allgemeinen Mittelwert μ .

Für die zufälligen Effekte der Vektoren u , q und e wird angenommen, dass sie nicht korreliert sind. Außerdem wird von einer Normalverteilung mit Mittelwert 0 und den Varianzen $G\sigma_u^2$, $D_{RMp}\sigma_q^2$ und $I\sigma_e^2$ ausgegangen. Dabei steht G für die genomweiten IBD-Wahrscheinlichkeiten. D_{RMp} stellt die Diplotypen-Verwandtschaftsmatrix der Position p eines vermeintlichen *QTL* dar und I verkörpert eine Identitätsmatrix.

Wie in Kapitel 3.2.10.2 beschrieben, entspricht die additiv-genetische Verwandtschaft zwischen Tier i und j an einer theoretischen *QTL* Position ($[D_{RM}]_{ij}$) mitten zwischen Marker 20 und 21 der Hälfte der Summe der IBD Wahrscheinlichkeiten ($\text{pr}(\cdot)$) zwischen den paternalen und maternalen Haplotypen beider Tiere ($Q_i^P, Q_i^M, Q_j^P, Q_j^M$) unter den gegebenen Genotypen ($|G$) von 20 *SNP* vor und 20 *SNP* nach der *QTL* Position Q :

$$[D_{RM}]_{ij} = \frac{1}{2}[\text{pr}(Q_i^P=Q_j^P|G) + \text{pr}(Q_i^P=Q_j^M|G) + \text{pr}(Q_i^M=Q_j^P|G) + \text{pr}(Q_i^M=Q_j^M|G)]$$

Die Designmatrizen X , Z_1 und Z_2 verknüpfen die beobachteten Werte mit den fixen und zufälligen Effekten.

3.2.10.4 Modelle der Kartierungen

Es wurden zwei unterschiedliche Kartierungsansätze gewählt. In einem Ansatz wurde der Phänotyp Wackelhorn als quantitatives, im anderen als qualitatives Merkmal modelliert. Um die beiden Modelle unterscheiden zu können, wird im Nachfolgenden das quantitative oder kontinuierliche Modell mit Modell K bezeichnet. Das qualitative oder diskontinuierliche Modell wird Modell D genannt.

Die Angaben über den Phänotyp des Hornstatus eines Tieres wurden vor dem Einsatz im gemischten linearen Modell in Form des Vektors y in Zah-

lenwerte umgewandelt. Im Modell K entstanden dafür fünf Gruppen, die die Abstufungen der Wackelhorngröße zwischen Wackelhorn-freien Tieren und Tieren mit sehr großen Wackelhörnern wiedergeben. Modell D teilt die Tiere hingegen nur in zwei Gruppen auf: Eine Gruppe trägt Wackelhörner in jeglicher Form, während die andere Gruppe Wackelhorn-frei ist.

Die Zuordnung zwischen Phänotypen und Ziffern in Modell K und D ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Zuordnung von Phänotypen und Ziffern in Modell K und D

Modell K (kontinuierlicher Phänotyp)		Modell D (diskontinuierlicher Phänotyp)	
Ziffer	Hornstatus	Ziffer	Hornstatus
1	Wackelhorn-frei	1	Wackelhorn-tragend
2	Kruste	2	Wackelhorn-frei
3	Wackelhorn von 0,5–5 cm Länge		
4	Wackelhorn von >5–10 cm Länge		
5	Wackelhorn >10 cm Länge		

Für die Tiersets 1–3 wurden jeweils Varianzkomponentenanalysen in Form der Modelle K und D erstellt. Die Gruppengrößen zu den einzelnen Phänotypen in den beiden Modellen zeigen die Tabellen 9 und 10.

Tabelle 9: Verteilung auf die Phänotypgruppen in Modell D

Tierset	1- Wackelhorn-tragend	2- Wackelhorn-frei
Tierset 1 (♂, ♀)	220	117
Tierset 2 (♂)	155	15
Tierset 3 (♀)	65	102

Tabelle 10: Verteilung auf die Phänotypgruppen in Modell K

Tierset	1 - Wackel- horn-frei	2 - Kruste	3- Wackel- horn 0,5-5 cm	4- Wackel- horn >5-10 cm	5- Wackel- horn > 10 cm
Tierset 1 (♂, ♀)	117	69	105	27	19
Tierset 2 (♂)	15	50	65	23	17
Tierset 3 (♀)	102	19	40	4	2

Alle Modelle wurden außerdem ein zweites Mal mit einem zusätzlichen fixen Effekt, der die Art der Hornlosmutation angab, berechnet. Diese Modelle werden durch den Buchstaben f, von f=friesisch, im Namen des Modells gekennzeichnet. Sie werden demnach als Modell Kf und Modell Df bezeichnet.

3.2.10.5 Likelihood Ratio Test

Beim Likelihood Ratio Test werden zwei Modelle miteinander verglichen, die sich in einem oder auch mehreren Parametern unterscheiden. Auf diese Weise wird untersucht, ob das komplexere Modell mit zusätzlichen Parametern die gegebenen Daten besser erklärt als das einfachere Modell.

Der Test wurde hier verwendet, um die Wahrscheinlichkeiten zwischen einem Modell mit fixen und polygenen Effekten (L_0) und einem Modell, welches zusätzlich *QTL*-Effekte enthält (L_1), ins Verhältnis zu setzen. Die *LRT*-Werte lassen sich mit der folgenden Formel berechnen:

$$LRT = -2 (\log L_0 - \log L_1)$$

Sie sind annäherungsweise X^2 verteilt mit einem Freiheitsgrad, welcher sich aus der Anzahl der unterschiedlichen Parameter zwischen den beiden Modellen ergibt (OLSEN et al., 2005).

Die ermittelten *LRT*-Werte wurden mit Microsoft Power Point graphisch dargestellt. Der Locus mit dem höchsten *LRT*-Wert stellt die wahrscheinlichste Position eines *QTL* dar.

3.2.10.6 Signifikanzschwelle der *cLDLA*

Zur Bestimmung der Signifikanzschwelle wurde ein gängiger P-Wert von 0,05 gewählt. Da bei der angewendeten Analyseverfahren eine Vielzahl von Fenstern auf das Vorliegen eines *QTL* getestet wurde, das heißt ein Mehrfachtest vorlag, erfolgte eine Korrektur nach Bonferroni.

Die Anzahl der Tests entspricht der Anzahl der unabhängigen getesteten Fenster mit 40 *SNPs*. Unabhängig bedeutet, dass sich die Fenster nicht überlappen. Die Anzahl der getesteten Fenster wurde daher durch 40 geteilt. Vorab musste die Zahl der getesteten Fenster aus der Gesamtfensterzahl bestimmt werden. Da jeweils in der Mitte eines 40 *SNP* Fensters getestet wurde, kam es zum Ausschluss der ersten und letzten 20 *SNPs* eines jeden Chromosoms. Pro Chromosom wurden demnach 40 Fenster von dessen Gesamtfensterzahl subtrahiert.

In Tierset 1 entsprach die Anzahl unabhängiger Fenster beispielsweise 1009,6 ($41624 - (31 \times 40) / 40 = 1009,6$). Der nach Bonferroni korrigierte P-Wert lag bei $4,95 \times 10^{-5}$ ($0,05 / 1009,6 = 4,95 \times 10^{-5}$). Sein entsprechender *LRT*-Wert hatte eine Höhe von 16,47 und bildete die Signifikanzschwelle. Die *LRT*-Werte für die weiteren Tiersets lagen bei 16, 44 für Tierset 2 und 16,47 für Tierset 3.

3.2.10.7 Auswertung der *cLDLA*

Im ersten Schritt der Auswertung der *cLDLA* fand eine Auswahl der in Microsoft Power Point aufgetragenen *LRT*-Maxima statt. Die Auswahl richtete sich nicht ausschließlich nach der Höhe des Einzelwerts, sondern berücksichtigte auch die Höhe der umliegenden *LRT*-Werte. Ein möglichst

kontinuierlicher An- und Abstieg zum Maximum hin bzw. von diesem weg entspricht am ehesten einer Assoziation zwischen dem Genotyp einer Gruppe von Tieren und dem relevanten Phänotyp. Die nähere Untersuchung der *LRT*-Maxima wurde mithilfe von Diplotypeffekten durchgeführt. Dazu wurde für jedes ausgewählte Maximum eine Tabelle erstellt, in der das Tierset nach der Diplotypeffektgröße sortiert wurde. Die Tabelle zeigte für jedes Tier die beiden 40 *SNP* großen Haplotypenfenster und einen dem Haplotyp sowie dem Diplotyp zugeordneten Zahlenwert. Der Zahlenwert begann jeweils bei eins und verlief fortlaufend für jeden neuen Haplo- bzw. Diplotyp. Die Tabelle enthielt weiterhin die Zahlenwerte für das Geschlecht, die Hornlosmutation und den Phänotyp eines Tieres. Darüber hinaus waren polygene Effekte und, je nach Tierset, Effekte, die das Geschlecht oder die Hornlosmutation betrafen, aufgetragen. Anhand der beschriebenen Tabellen konnten Rückschlüsse auf die Haplo- bzw. Diplotypen gezogen werden, die ein Maximum bedingten.

3.2.11 *SNP*-basierte genomweite Assoziationsstudie (GWAS)

Für Vergleichszwecke wurden zusätzlich zu den Kartierungen mittels *cLDLA*, genomweite Assoziationsanalysen auf Basis von *SNPs* erstellt. Dazu fanden die gleichen 12 Modell-Tierset-Kombinationen, die auch mittels *cLDLAs* berechnet wurden, Verwendung.

3.2.11.1 Durchführung der GWAS

Die Datenvorbereitung erfolgte mithilfe des Programms PLINK (PURCELL et al., 2007). Im Anschluss daran berechnete das Programm GCTA (YANG et al., 2011) aus den mittels PLINK erstellten Eingabedateien eine genomweite Assoziationsanalyse. Die Berechnung der Assoziationsanalyse lässt sich in drei Schritte einteilen. Zuerst wird eine additiv-genetische Verwandtschaftsmatrix (**G_{RM}**) angefertigt. Danach erfolgt die Schätzung der Varianzkomponenten und abschließend wird für jeden *SNP* eine statistische Assoziation mit dem Phänotyp berechnet. Es wurde die Option eines gemischten

linearen Modells gewählt, bei dem die Berechnung der G_{RM} ohne das Chromosom mit dem Kandidaten-*SNP* ausgeführt wird. Diese Option trägt die englische Bezeichnung MLMA-LOCO = *mixed linear model association leave-one-chromosome-out*. Im Vergleich zu der Methode, bei welcher der Kandidaten-*SNP* in die Berechnung der G_{RM} Eingang findet, bietet sie eine höhere Teststärke (YANG et al., 2014).

Neben den 29 Autosomen wurden auch die Geschlechtschromosomen in die Analyse einbezogen. Im Fall von Y wurden dazu die Marker der pseudoautosomalen Regionen herangezogen, die wie ein weiteres autosomales Chromosom behandelt wurden.

Als fixer Effekt wurde stets das Alter eines Tieres angegeben und in den entsprechenden Tiereset-Modell-Kombinationen von Geschlecht und Hornlosmutation ergänzt.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde aus dem geschätzten P-Wert eines jeden *SNP* der negativ dekadische Logarithmus gezogen.

3.2.11.2 Signifikanzschwelle der GWAS

Der gewählte P-Wert lag wie bei der *cLDLA* bei 0,05. In Tiereset 1 wurden insgesamt 42 000 *SNPs* mit einer MAF > 2,5 % getestet. Daraus ergab sich nach Bonferroni-Korrektur ein signifikanter P-Wert von $1,18 \times 10^{-6}$ ($0,05/42200$). Der negativ dekadische Logarithmus von $1,18 \times 10^{-6}$ ist 5,93 und bildete die Signifikanzschwelle. In Tiereset 2 lag die Anzahl der getesteten *SNPs* bei 41 745, was zu einem Schwellenwert von 5,92 führte. Auch in Tiereset 3 veränderte sich die Signifikanzschwelle ausgehend von 42 188 Markern kaum und hatte einen Wert von 5,93.

3.2.12 Erstellung der Röntgenaufnahmen der Hörner

Die Röntgenaufnahmen der Hörner wurden in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München erstellt. Dazu wurde die Röntgenanlage Vertex Top mit der Röntgenröhre OPTITOP 150/40/80 HC der Firma Siemens in Kombination mit einer Speicherfolien-Technik verwendet. Der Film-Fokus-Abstand betrug ca. 100 cm. Je nach Größe der Hörner wurden Spannungen zwischen 48 und 60 kV und ein mAs-Produkt von 18 bis 40 gewählt. Die Röntgenkassette hatte eine Größe von 35,4 × 43 cm. Für jedes Hornpaar wurde ein Bild erstellt und mithilfe des Speicherfoliensystems FCR XG-1 vom Hersteller Fujifilm ausgelesen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Phänotypen heterozygot hornloser Tiere

In den nachfolgend vorgestellten Ergebnissen zu den Phänotypen Wackelhorn-tragender und Wackelhorn-freier Tiere wurden ausschließlich Tiere einbezogen, die während der Projektlaufzeit eigenhändig untersucht wurden.

4.1.1 Adulte Wackelhorn-tragende Tiere

Alle 174 genetisch hornlosen Fleckviehtiere mit Wackelhörnern besaßen den Genotyp Pp. Tiere des Genotyps PP waren ausnahmslos Wackelhorn-frei. Die Prävalenz der Wackelhorn-tragenden Pp Tiere war zwischen den Geschlechtern signifikant ($P < 0,05$) verschieden. Von insgesamt 92 männlichen Tieren trugen im Alter von über eineinhalb Jahren 76 Bullen Wackelhörner. Das entspricht einem Anteil von rund 83 %. Bei den 209 weiblichen Pp Tieren im Alter von über zweieinhalb Jahren wiesen 42 Tiere Wackelhörner auf. In der Stichprobe waren damit 20 % der weiblichen Tiere entsprechenden Alters Wackelhorn-tragend (Abb. 8).

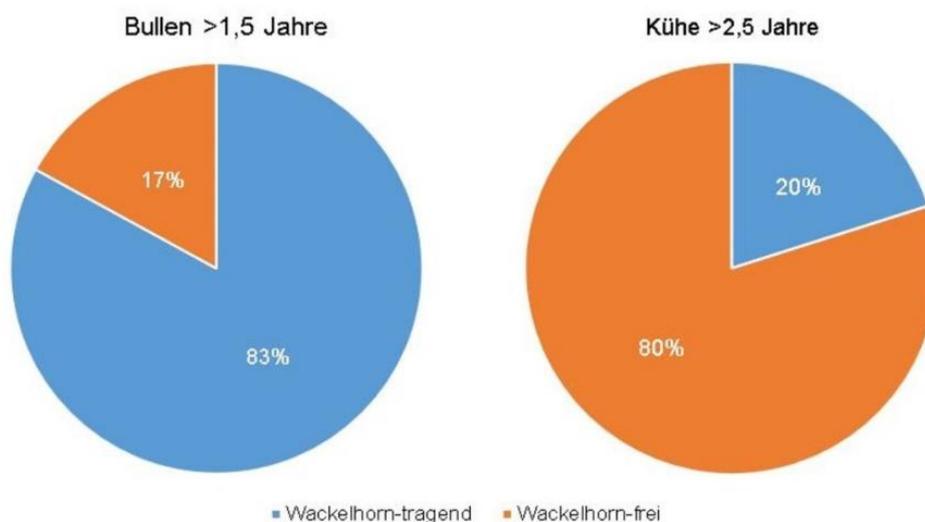


Abbildung 8: Verhältnis Wackelhorn-tragender zu Wackelhorn-freien Pp Tieren in Bullen und Kühen

Auch die Größe der Wackelhörner zeigte geschlechtsbezogene Unterschiede. Diese Unterschiede sollen anhand von 76 Wackelhorn-tragenden Bullen und 37 Wackelhorn-tragenden Kühen, deren Phänotypen mithilfe des Fragebogens (Anhang 1) erfasst wurden, gezeigt werden (Tab. 11). Die Tiere wurden nach ihrer Wackelhornlänge in vier Gruppen eingeteilt und einander gegenübergestellt. Besaß ein Tier zwei Wackelhörner unterschiedlicher Länge, diente das Maß des längeren Wackelhorns der Gruppenzuordnung.

Die 76 untersuchten Wackelhorn-tragenden Bullen bewegten sich zum Zeitpunkt der Messung in einer Altersspanne von 1,2 bis 8,3 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 2,8 Jahren.

Die 37 Wackelhorn-tragenden Kühe befanden sich im Alter zwischen 1,2 bis 9,3 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 3,5 Jahren.

Bullen zeigten häufiger größere Wackelhornformen als Kühe. Vergleicht man die Anteile der Tiere die Wackelhörner über 5 cm Größe besitzen, so sind das 38,1 % der Bullen, aber nur 10,8 % der Kühe. Somit war der Anteil der Bullen mit relativ langen Wackelhörnern signifikant ($P < 0,05$) höher, als bei den durchschnittlich älteren Kühen.

Bei Kühen entfällt auch die zahlenmäßig stärkste Gruppe mit 51,4 % auf Tiere mit der kleinsten Wackelhornform, der Kruste. Diese Gruppe wird bei den Bullen mit 32,9 % von den Tieren mit kleinen Wackelhörnern bis 5 cm Größe gestellt.

Tabelle 11: Verteilung der Wackelhorngröße bei Bullen und Kühen

	Kruste	WH 0,5–5 cm	WH >5–10cm	WH >10 cm
Bullen	22 (28,9 %)	25 (32,9 %)	15 (19,7 %)	14 (18,4 %)
Kühe	19 (51,4 %)	14 (37,8 %)	3 (8,1 %)	1 (2,7 %)

Weiterhin zeigte sich, dass das Wachstum von Wackelhörnern von Tier zu Tier stark unterschiedlich ist. Diese Eigenschaft soll an einem Beispiel verdeutlicht werden: Im Probenmaterial befanden sich acht Bullen im Alter zwischen 4,1 und 4,4 Jahren, deren Hornstatus in Tabelle 12 dargestellt wird. Die Variation der Größe und die teilweise vorhandene asymmetrische Ausprägung von Wackelhörnern innerhalb desselben Geschlechts und derselben Altersgruppe präsentieren deutlich die Komplexität dieses Merkmals.

Tabelle 12: Wackelhorngröße bei Bullen im Alter von 4,1–4,4 Jahren

Bullen mit den gleichen Ziffern sind väterliche Halbgeschwister.

	Hornstatus rechts	Hornstatus links
Bulle 1 a	Kruste	Kruste
Bulle 1 b	Wackelhorn 12 cm	Wackelhorn 7cm
Bulle 2 a	Wackelhorn 1 cm	Kruste
Bulle 2 b	Wackelhorn 22 cm	Wackelhorn 22 cm
Bulle 3	Wackelhorn-frei	Kruste
Bulle 4	Wackelhorn 2 cm	Wackelhorn 6 cm
Bulle 5	Wackelhorn ca. 15 cm (Spitze abgesägt)	Wackelhorn ca. 15 cm (Spitze abgesägt)
Bulle 6	Wackelhorn 21 cm	Wackelhorn 22 cm

Ein weiteres Merkmal mit individueller Komponente stellt der Zeitpunkt der Entstehung von Wackelhörnern dar. Während der Studie konnten mehrere Bullen beobachtet werden, die erst im Alter von über 12 Monaten mit der Ausbildung von Krusten begannen. Darüber hinaus wurden zwei Fälle festgestellt, in denen Kühe im Alter von über zwei Jahren eine Kruste ausbildeten. Die beiden Kühe waren mit 2,4 und 3,6 Jahren als ein- bzw. beidseitig hornlos beurteilt worden und trugen bei einer späteren Kontrolle neu entstandene Krusten. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Fällen um Ausnahmen handelt. Dennoch erschien ein möglichst hohes Mindestalter für Wackelhorn-freie Tiere innerhalb der Kartierungsstudie als sinnvoll.

4.1.2 Adulte Wackelhorn-freie Tiere

Die Anteile Wackelhorn-freier Tiere unterschieden sich zwischen Tieren mit keltischer und friesischer Hornlosmutation.

Von 77 Bullen mit keltischer Mutation waren nur sechs Bullen (8 %) Wackelhorn-frei. Unter den 15 Bullen mit friesischer Mutation waren zehn Bullen (67 %) Wackelhorn-frei. Trotz relativ kleiner Stichprobe in der zweiten Gruppe wurde dieser Unterschied als signifikant ($P < 0,05$) bestätigt.

Bei den insgesamt 168 keltisch hornlosen Kühen waren 128 (76 %) Tiere Wackelhorn-frei, während es bei den 39 friesisch hornlosen Kühen 37 (95 %) Tiere waren. Auch in diesem Fall konnte ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) festgestellt werden. Damit lässt sich eine Tendenz erkennen, nach der Tiere mit friesischer Hornlosmutation seltener Wackelhörner ausbilden könnten. Da jedoch die Herkunft der friesischen Tiere auf wenige Familien beschränkt war, kann dieses Ergebnis auch durch Stratifikation der Stichprobe entstanden sein und muss mit Vorsicht bewertet werden.

In der kleinen Gruppe der Wackelhorn-freien Bullen konnte bei sieben Tieren eine phänotypische Besonderheit beobachtet werden. An den Hornansatzstellen befanden sich ein- oder beidseitig kürzere oder längere, furchenartige Vertiefungen des Stirnbeins (Abb.9). Aus dieser Gruppe gehörten fünf Bullen der gleichen Familie an und besaßen die friesische Hornlosmutation. Es handelte sich um einen Vater mit vier seiner Söhne, aus einer Familie in der auch verzögertes Hornwachstum auftritt (s. Kapitel 4.1.6) Die beiden weiteren Bullen waren unverwandt und trugen die keltische Hornlosmutation. Im Stammbaum bei einem der beiden keltischen Bullen fand sich jedoch auch ein Tier, das der Linie der oben genannten friesischen Familie mit verzögertem Hornwachstum angehörte.



Abbildung 9: Pp Fleckviehbulle mit Vertiefung an der Hornansatzstelle (ausrasiert) (Quelle: Lucas Fritzer, Bayern-Genetik GmbH)

4.1.3 Stirnbeulen bei adulten Kühen

Eine weitere bereits bekannte Besonderheit stellten Tiere mit Stirnbeulen dar. Stirnbeulen zählen wie in Kapitel 2.1.6.1 angesprochen nicht im eigentlichen Sinn zu den Wackelhörnern, sondern werden als Basis gesehen, auf der bei heterozygoten Tieren häufig Wackelhörner entstehen. Auch bei homozygoten Tieren konnten gelegentlich Stirnbeulen beobachtet werden.

Ihre Gestalt war in der Regel die einer knöchernen, halbkugelförmigen Erhebung verschiedener Größe von etwa 0,5 bis 4,5 cm. Im Folgenden soll zwischen kleineren und größeren Ausprägungsformen unterschieden werden. Stirnbeulen mit einer Größe von unter 2 cm werden als kleine Stirnbeulen bezeichnet, während große Stirnbeulen einer Größe gleich oder größer 2 cm entsprechen.

Die Häufigkeit des Merkmals Stirnbeulen soll anhand von 102 weiblichen Pp Tieren, die bei der 2. Phase der Probennahmen und in der Bayrischen Landesanstalt für Landwirtschaft phänotypisch untersucht wurden, gezeigt werden. Innerhalb dieser Gruppe war das Merkmal Stirnbeulen auf folgende Weise verteilt: 7 Tiere mit großen Stirnbeulen, 57 Tiere mit kleinen Stirnbeulen, 19 Tiere mit Stirnbeulen unter den Wackelhörnern, 3 Tiere ohne Stirnbeulen und mit Wackelhörnern, und 16 Tiere ohne Stirnbeulen und ohne Wackelhörner. Somit besaßen 83 der 102 untersuchten Tiere (81,4 %) eine mehr oder weniger ausgeprägte Form der Stirnbeule.

4.1.4 Juvenile Wackelhorn-tragende und Wackelhorn-freie Tiere

Bei der Untersuchung der Hornansatzstellen junger Kälber konnte eine Vielzahl von Phänotypen beobachtet werden. Die Variation reichte von Tieren ohne Auffälligkeiten, die als glatt hornlos bezeichnet wurden, über Tiere mit Vertiefungen, kleinen Stirnbeulen oder Krusten bis hin zu sehr kleinen Wackelhörnern. Auch Kombinationen aus diesen Phänotypen wurden gesehen. Neben der bekannten Kombination aus Stirnbeule und Kruste wurde in zwei Fällen auch die bisher unbekannte Kombination von Vertiefungen mit darin liegenden Krusten beobachtet.

Bei den Untersuchungen konnte auch die früheste Entstehungsphase einer Kruste beobachtet werden. Diese Phase ist durch ein mehr oder weniger kreisförmiges Ausfallen der Haare an der Hornansatzstelle gekennzeichnet. An ihrer Stelle bilden sich kleine Hornschüppchen, die zu Beginn auch teilweise wieder abblättern können. Nachfolgend kommt es zur Bildung einer hauchdünnen, meist ebenen Hornfläche.

Die insgesamt 151 untersuchten heterozygot hornlosen Kälber im Alter von vier bis zehn Wochen stammten aus sechs homozygot hornlosen Bullen. Dabei waren 107 Kälber Nachkommen desselben Bullen, der als Bulle I bezeichnet werden soll. Bulle I wurde aufgrund seiner hohen genomischen Zuchtwerte im Untersuchungszeitraum sehr frequent in der Besamung eingesetzt und stand im Verdacht, besonders häufig Vater Wackelhorn-

tragender Kälber zu sein. Die restlichen 44 Kälber stammten aus fünf weiteren Bullen.

Für die Bestimmung der Anteile Wackelhorn-tragender Kälber wurden die Nachkommen von Bulle I getrennt von den Kälbern der anderen Bullen betrachtet.

Es wurden 98 männliche Nachkommen des Bulle I untersucht, unter denen sich 15 Kälber (15,3 %) mit Krusten oder sehr kleinen Wackelhörnern befanden. Von den neun weiblichen Nachkommen hatte ein Kalb (11,1 %) Krusten.

Aus fünf weiteren Bullen wurden 41 männliche Kälber untersucht, von denen ein Tier (2,4 %) Krusten trug. Drei weibliche Kälber waren Wackelhornfrei.

4.1.5 Tiere mit Phänokopien

Phänokopien besitzen besondere Ähnlichkeit zu einem betrachteten Phänotyp, haben aber andere Ursachen als dieser. So kann zum Beispiel ein ähnlich erscheinendes Merkmal nicht durch die Gene, sondern durch die Umwelt ausgeprägt worden sein. Gleichfalls sind allerdings auch andere genetische Ursachen als Auslöser für eine Phänokopie möglich (GRAW, 2015).

Während der Studie gab es eine Vielzahl von Fällen, bei denen Tiere als Wackelhorn-tragend eingestuft wurden, bis das Hornlostestergebnis eine fehlende Hornlosmutation enthüllte. Die Hornformen dieser Tiere sind demnach als Phänokopien zu bezeichnen. Es konnten hierfür zwei umweltassoziierte und eine genetische Ursache ermittelt werden.

Die wahrscheinlich häufigste Ursache ist umweltbedingt. Es handelt sich um die Nachbildung von Hornstummeln und Krusten nach einer Enthornung. Besonders männliche Tiere bilden regelmäßig trotz Enthornung Stummelhörner aus. Bei weiblichen Tieren konnten deutlich weniger solcher Fälle beobachtet werden. Als weitere Ursache können auch Verletzungen der Hörner zu Verformungen wie zum Beispiel hängenden Hörnern führen.

Die dritte Ursache ist genetischer Natur und ist unter der Bezeichnung „verzögertes Hornwachstum“ bekannt. Das verzögerte Hornwachstum wird in bestimmten Fleckviehlinien hin und wieder beobachtet. Auch während der Studienlaufzeit wurden Tiere mit spät einsetzendem Hornwachstum gefunden. Zudem konnten Tiere entdeckt werden, die selbst im Erwachsenenalter noch ausschließlich Krusten oder Stummelhörner trugen. Tatsächlich ließen sich aus den Pedigrees dieser Tiere häufig Übereinstimmungen unter den Vorfahren bestimmen.

Es scheint also zumindest eine, sehr wahrscheinlich aber mehrere, weitere genetische Dispositionen für die teilweise Unterdrückung des Hornwachstums im Fleckvieh zu geben.

4.1.6 Wackelhorn-freie Bullen aus Linien mit verzögertem Hornwachstum

Da während dieser Studie nur wenige heterozygot hornlose, Wackelhorn-freie Bullen gefunden wurden, kam diesen Tieren besondere Aufmerksamkeit zu.

Dabei wurde festgestellt, dass 10 von 16 Tieren Vorfahren aus Linien mit verzögertem Hornwachstum besaßen.

Als Beispiel soll eine Fleckviehlinie gezeigt werden, in der nicht nur die Vorfahren mit verzögertem Hornwachstum auffielen, sondern auch Fälle in der Nachzucht bekannt wurden.

Es handelt sich um die Familie des genetisch gehörnten Bullen X. Bulle X hatte Kälber, die verzögertes Hornwachstum zeigten. Auch sein gehörnter Halbbruder fiel durch solche Kälber auf. Während der Projektlaufzeit konnten ein heterozygot hornloser Sohn und sechs heterozygot hornlose Enkel von Bulle X phänotypisch untersucht werden. Alle Tiere waren Wackelhornfrei. Fünf der Tiere gehörten überdies zu der in Kapitel 4.1.2 vorgestellten Gruppe mit Vertiefungen am Stirnbein (Abb. 10). Unter der Nachzucht des Sohnes und eines Enkels von Bulle X konnte je ein gehörnter Nachkomme mit verzögertem Hornwachstum beobachtet werden. Im Fall der Nachzucht des Enkels von Bulle X war dies ein Kuhkalb, dessen Hornstatus von Geburt an mitverfolgt werden konnte. Das Kalb wurde mit Krusten geboren und zeigte mit viereinhalb Monaten zunächst etwa 1,5 cm lange, wackelnde Stummelhörner. Bei einer Nachuntersuchung mit 17 Monaten waren die Hörner fest mit dem Stirnbein verwachsen und hatten eine Länge von 8 cm erreicht.

Das vorgestellte Material ist viel zu klein für eine statistisch einwandfreie Nachweisführung. Es deutet aber darauf hin, dass eine genetische Prädisposition für verzögertes Hornwachstum bei pp Tieren in der Kombination mit der Hornlosmutation in Pp Tieren zu vermehrt Wackelhorn-freien Phänotypen und sogar zu Vertiefungen des Stirnbeins führen kann.

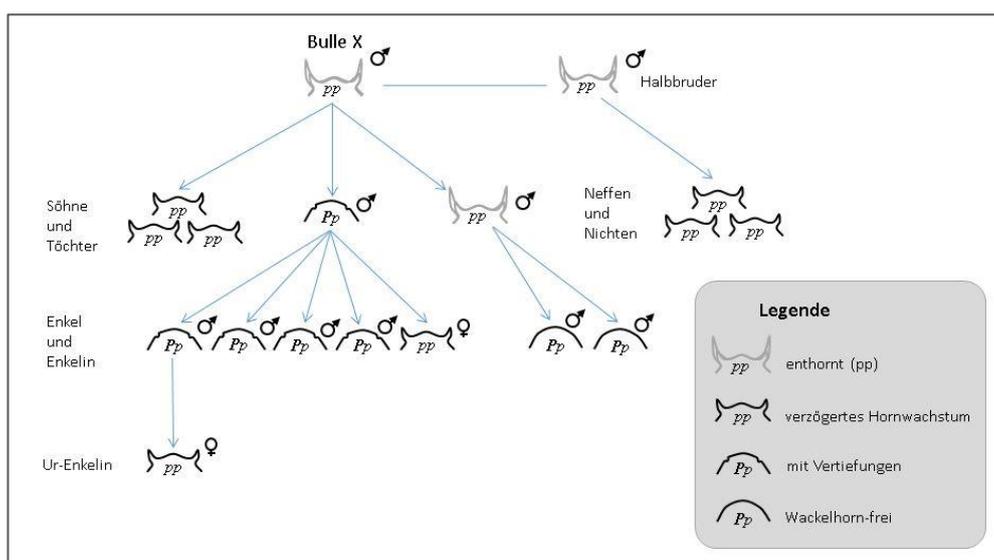


Abbildung 10: Hornstatus in der Familie des Bullen X

4.2 Ergebnisse der kombinierten Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungskartierungen (*cLDLAs*)

Im Folgenden werden die Ergebnisse der mittels kontinuierlicher und diskontinuierlicher Modelle durchgeführten *cLDLAs* von Tierset 1 bis 3 präsentiert. Zwei Tierset-Modell-Kombinationen führten aufgrund einer ungünstigen Datenverteilung zu keiner Log-Likelihood-Konvergenz und waren somit nicht auswertbar. Es handelte sich um die Modelle D und Df des Tiersets 2 (Tab. 13). Die Instabilität dieser Modelle ist auf eine unausgewogene Verteilung der Tiere auf die Phänotypgruppen zurückzuführen. Es standen 155 Wackelhorn-tragende Bullen nur 15 Wackelhorn-freien Tieren gegenüber. In vier weiteren Tierset-Modell-Kombinationen kam es vereinzelt zu Konvergenz-Problemen. Eine Übersicht über die Auswertbarkeit aller Tierset-Modell-Kombinationen bietet Tabelle 13.

Tabelle 13: Auswertbarkeit der Kartierungsmodelle

✓ auswertbar; (✓) vereinzelt falsche Werte; – nicht auswertbar

Tierset	N	Wackelhorn-tragend	Wackelhorn-frei	Modell K	Modell Kf	Modell D	Modell Df
Tierset 1 (σ , φ)	337	220	117	✓	✓	✓	✓
Tierset 2 (σ)	170	155	15	✓	✓	–	–
Tierset 3 (φ)	167	65	102	(✓)	(✓)	(✓)	(✓)

4.2.1 *cLDLAs* von Tierset 1

In Tierset 1 befanden sich 337 heterozygot hornlose Fleckviehtiere. Die genomweite Signifikanzschwelle lag bei einem *LRT* Wert von 16,47 und konnte weder in den kontinuierlichen noch in den diskontinuierlichen Modellen erreicht werden (Abb. 11).

Die *LRT*-Maxima, die aufgrund ihrer Lage, ihrer Form und ihrer Höhe mittels Diplotypeffekten genauer untersucht wurden, sind in Tabelle 14 enthalten.

Tierset 1

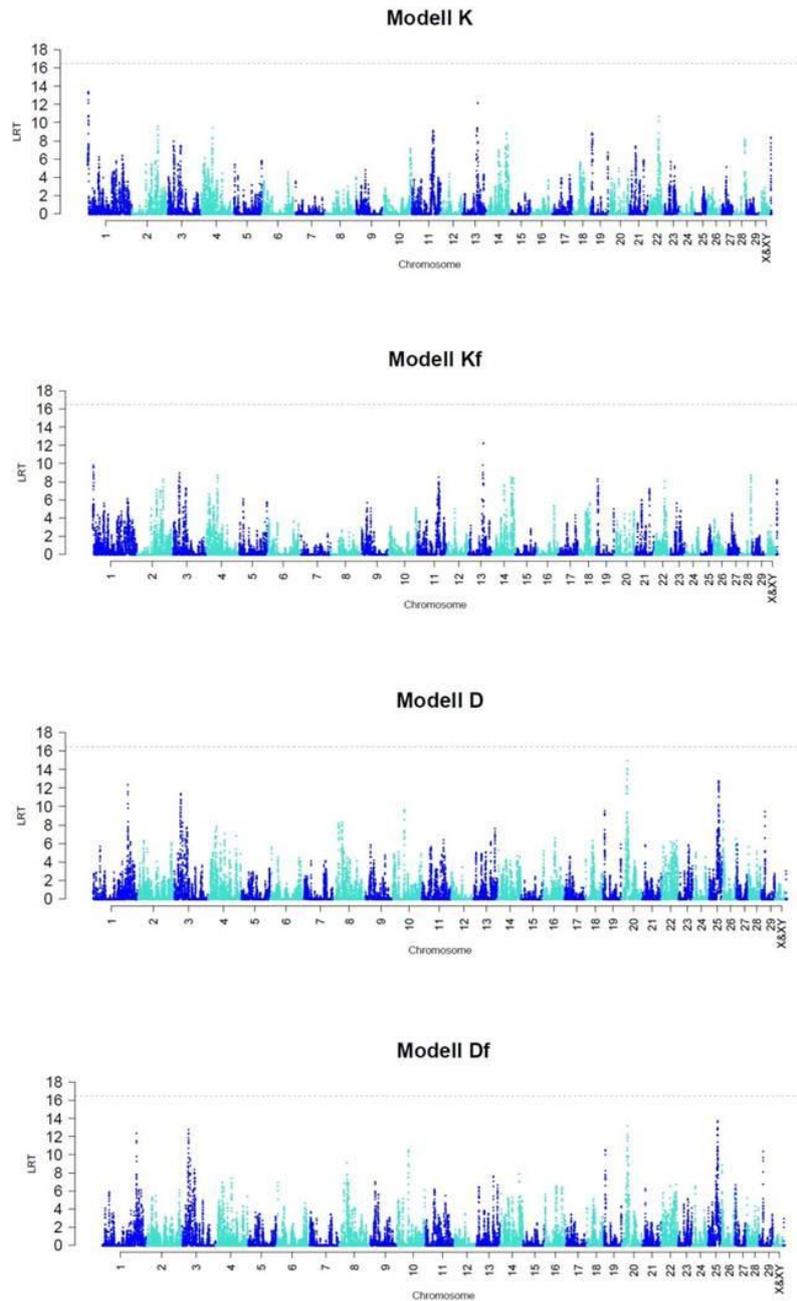


Abbildung 11: Ergebnisse der *cLDLAs* von Tierset 1

X-Achse: Chromosomen; Y-Achse: *LRT*-Wert; gestrichelte Linie: genomweite Signifikanzschwelle bei *LRT* 16,47

Tabelle 14: LRT-Maxima des Tiersets 1

Modell	Chromosom	Pos. [bp]	LRT
K	1	2 251 360	13,34
Kf	1	2 251 360	9,79
K	13	56 670 240	12,64
Kf	13	56 670 240	12,22
K	XY	145 273 584	8,36
Kf	XY	145 221 968	8,14
D	3	26 318 642	9,64
Df	3	27 528 098	12,73
D	20	18 556 532	14,96
Df	20	18 556 532	13,19
D	25	31 973 152	12,75
Df	25	32 535 772	13,69

Die Auswertung der Diplotypeffekte für die einzelnen Maxima führte innerhalb dieses Tiersets nur zu wenig brauchbaren Ergebnissen. In der überwiegenden Zahl der Fälle war eine Aussage bezüglich der Tiergruppe, die ein Maximum verursachte, nicht klar zu treffen. Eine Ausnahme bildete das Maximum auf Chromosom 1 in Modell K, das sich nahe an der Position der friesischen Hornlosmutation befand und dementsprechend zu großen Teilen von Wackelhorn-freien Tieren mit friesischer Hornlosmutation verursacht wurde. Diese Annahme bestätigte das abfallende Maximum an gleicher Stelle in Modell Kf, in dem die Hornlosmutation als fixer Effekt einbezogen wurde.

Alle Maxima bis auf das Maximum auf Chromosom 13 in Modell K und Kf zeigten zwar eine befriedigende Zuordnung zwischen den Diplotypeffekten und den Phänotypen, aber es gab keine größere Gruppe gleicher Phänotypen, die durch einen gemeinsamen Haplotyp verbunden war.

In manchen Phänotypgruppen wurden zumindest kleinere Einheiten von Tieren mit gleichem Haplotyp gefunden. Doch der Haplotyp war nur selten spezifisch für die Tiergruppe und trat auch bei Tieren mit anderem Phänotyp auf.

4.2.2 *cLDLAs* von Tierset 2

In den beiden kontinuierlichen Modellen des Tiersets 2, dessen genomweite Signifikanzschwelle bei einem *LRT* von 16,44 lag, waren 170 heterozygot hornlose Bullen enthalten (Abb. 12).

Mit einem *LRT*-Wert von 22,54 auf Chromosom 1 im Modell K konnte in diesem Tierset ein signifikanter Wert gefunden werden. Weiterhin kam ein zweiter Wert auf Chromosom 10 mit einem *LRT* von 16,17 sehr nahe an die Signifikanzschwelle heran. Die beiden genannten sowie weitere ausgewählte Maxima sind in Tabelle 15 aufgelistet.

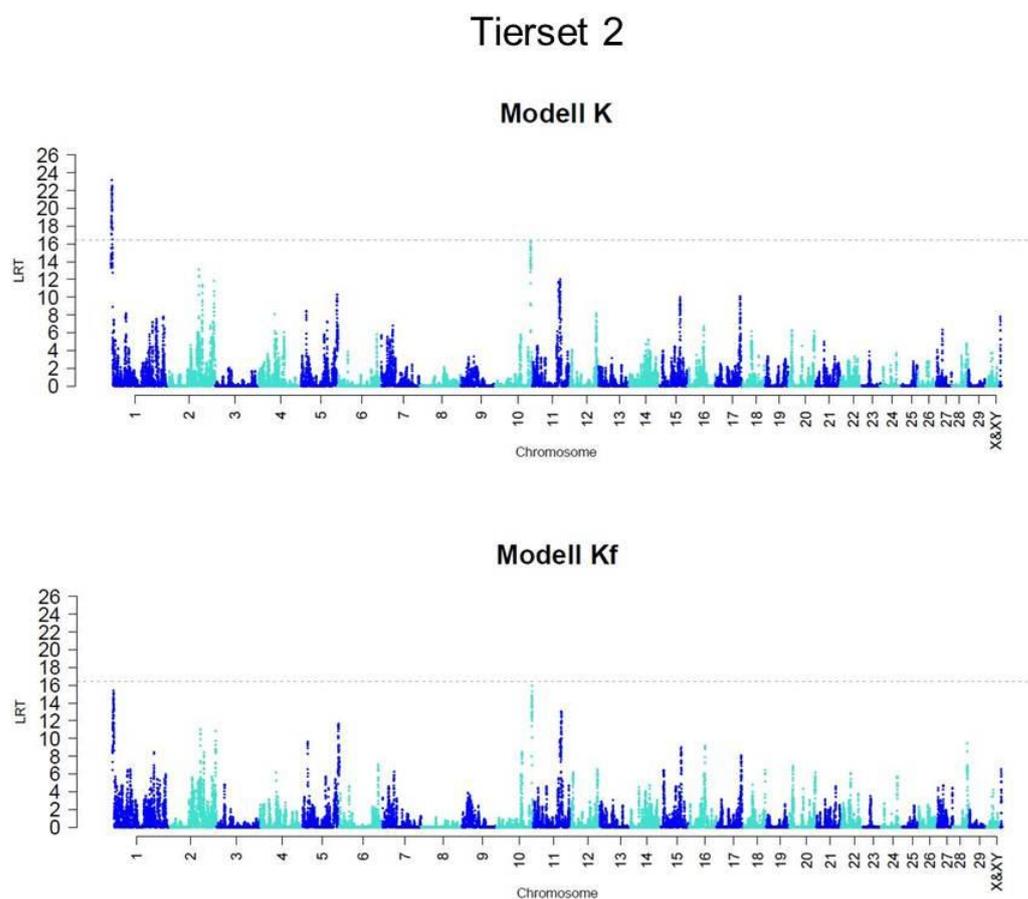


Abbildung 12: Ergebnisse der *cLDLAs* von Tierset 2

X-Achse: Chromosomen; Y-Achse: *LRT*-Wert; gestrichelte Linie: genomweite Signifikanzschwelle bei *LRT* 16,44

Tabelle 15: LRT-Maxima des Tiersets 2

Modell	Chromosom	Pos. [bp]	LRT
K	1	2 960 005	22,54
Kf	1	2 960 005	15,11
K	2	87 763 216	13,08
Kf	2	87 763 216	11,05
K	10	99 022 024	16,17
Kf	10	99 473 424	15,91
K	11	77 457 152	11,97
Kf	11	77 702 896	13,06
K	XY	145 221 968	7,81
Kf	XY	145 221 968	6,54

Der signifikante Wert auf Chromosom 1 im Modell K befindet sich, wie es bereits in Tierset 1 der Fall war, nahe der Stelle der friesischen Hornlosmutation. Der *LRT*-Wert war bei Tierset 2 um rund neun Punkte höher, da noch mehr friesische Bullen als friesische Kühe keine oder vermehrt kleinere Wackelhornformen besaßen. Auch in diesem Tierset ging das Maximum im Modell Kf erheblich zurück und fiel bis unter die Signifikanzschwelle. Trotzdem zeigt die verbliebene Höhe von 15,11 Punkten, dass an dieser Stelle auch andere Haplotypen als die, welche die Hornlosmutationen bedingen, eine Rolle spielen.

Für die Maxima der Modelle K/Kf auf Chromosom 10 ließen sich vor allem für die großen Wackelhornformen mehrere häufiger auftretende Haplotypen finden. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Maxima vermehrt durch Tiere mit großen Wackelhörnern bedingt waren.

In den weiteren *LRT*-Maxima auf Chromosom 2, 11 und XY konnte keine Tendenz für eine ursächliche Phänotypgruppe bestimmt werden, aufgrund derer die Maxima entstanden.

4.2.3 *cLDLAs* von Tierset 3

Tierset 3 mit 167 Kühen hatte eine genomweite Signifikanzschwelle von 16,47.

Sowohl in den kontinuierlichen als auch in den diskontinuierlichen Modellen dieses Tiersets traten falsch positive *LRT*-Werte auf, die durch Log-Likelihood-Konvergenz Probleme verursacht wurden. Möglicherweise war auch hier eine ungleichmäßige Belegung der Phänotypgruppen ursächlich (siehe Tab. 13).

In allen Modellen des Tiersets 3 konnte kein nennenswertes Maximum ermittelt werden. Bei den Maxima der Chromosomen 10 und 25, die in Abbildung 13 zu erkennen sind, handelt es sich um Regionen mit Log-Likelihood-Konvergenz Problemen. Ein vergrößertes Tierset, das heißt zusätzliche umfassend untersuchte Pp Fleckviehkühe könnten solche solitär hohen *LRT*-Werte (Chromosomen 10 und 25) entweder bestätigen oder widerrufen.

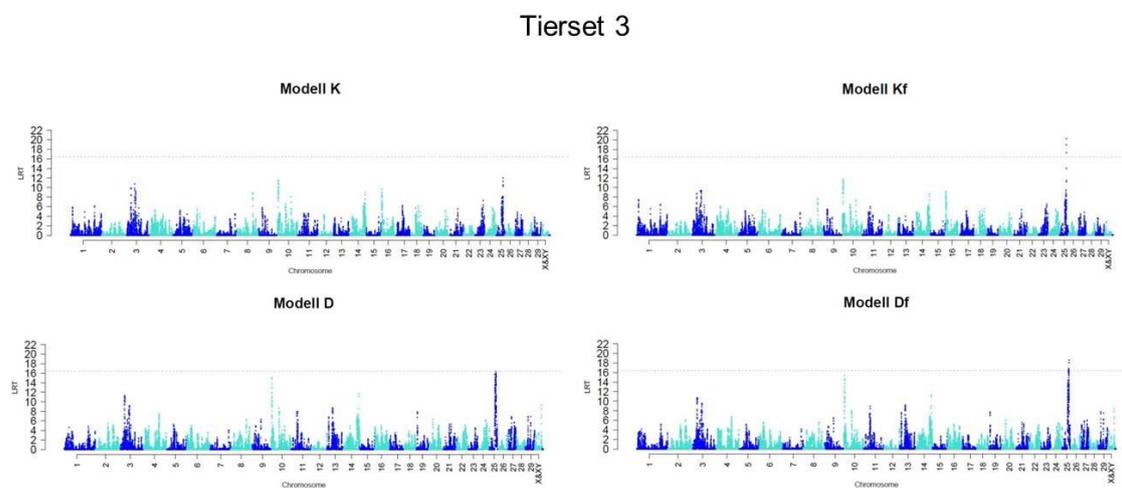


Abbildung 13: Ergebnisse der *cLDLAs* von Tierset 3

X-Achse: Chromosomen; Y-Achse: *LRT*-Wert; gestrichelte Linie: genomweite Signifikanzschwelle bei *LRT* 16,47

4.3 Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalysen (GWAS)

Von den 12 Modell-Tierst-Kombinationen, für welche auch Assoziationsanalysen (GWAS) durchgeführt wurden, konnten zwei Kombinationen nicht berechnet werden. Betroffen waren die kontinuierlichen Modelle des Tierst 3. Es ist anzunehmen, dass die Ursache auch hier bei der ungünstigen Verteilung der Tiere auf die Phänotypgruppen zu suchen ist.

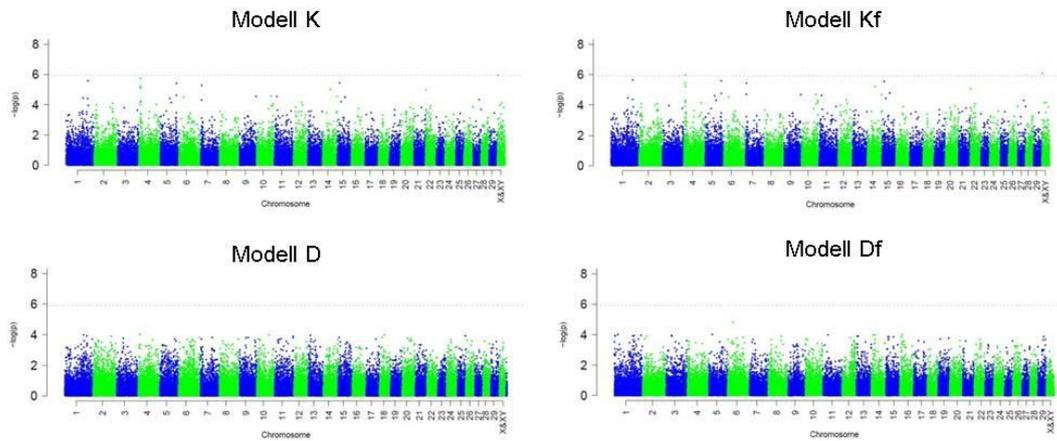
Die Auswertung durchgeführter GWAS (Abb. 14) ergab nur drei schwach signifikante Maxima. Dabei wurde die Signifikanzschwelle, die bei allen Tierst eine Höhe von 5,9 ($-\log_{10}(P)$) aufwies, in acht von zehn Analysen nicht erreicht.

Die schwach signifikanten Maxima wurden in Modell K und Kf des Tierst 1 ermittelt (Tab.16). Sie lagen kaum oberhalb der Signifikanzschwelle auf Chromosom 4 und Chromosom X und wurden nicht durch benachbarte signifikante oder indikative SNPs unterstützt. Bei einem Vergleich mit den Ergebnissen der *cLDLA* konnte keine Übereinstimmung gefunden werden.

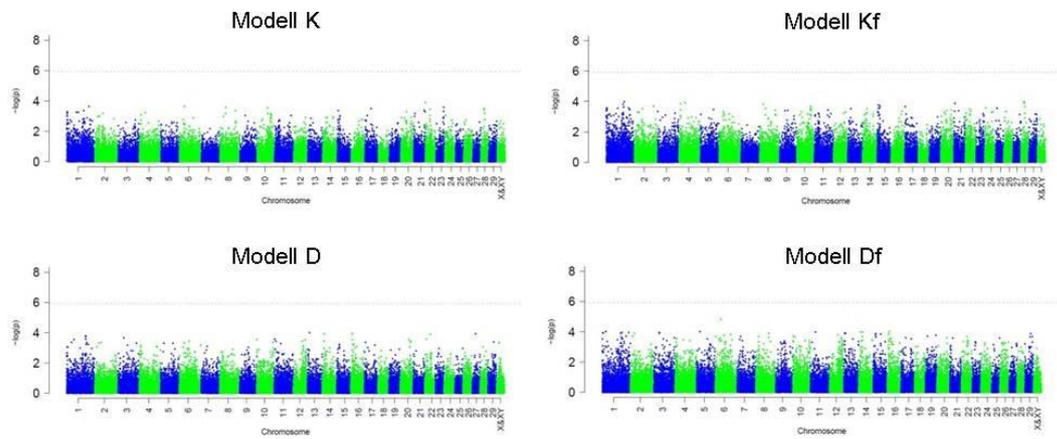
Tabelle 16: GWAS-Maxima von Tierst 1

Modell	Chromosom	SNP-Name	Pos. [bp]	$-(\log(p))$
Kf	4	BTA-109398-no-rs	10 261 371	5,98
K	X	BTB-01347134	1 794 831	5,95
Kf	X	BTB-01347134	1 794 831	6,07

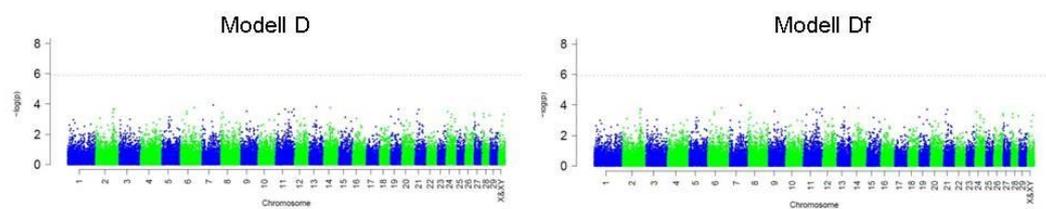
Tierset 1



Tierset 2



Tierset 3

**Abbildung 14: Ergebnisse der GWAS**

X-Achse: Chromosomen; Y-Achse: $-(\log(p))$; gestrichelte Linie: Signifikanzschwelle bei 5,9

4.4 Ergebnisse der Pneumatisationsstudie

Unter den 93 mittels Röntgenaufnahmen untersuchten Fleckvieh-Hornpaaren befanden sich neun Hornpaare, die anhand ihrer äußeren Form und des knöchern durchbauten *Processus cornualis* Wackelhörnern glichen. Aus den entnommenen Gewebeproben wurde deshalb für jedes der Tiere ein Hornlostest durchgeführt. In allen neun Fällen konnte keine Hornlosmutation nachgewiesen werden. Acht der Hornpaare wurden aufgrund einer starken Deformation aus der Studie ausgeschlossen. Als wahrscheinlichste Ursache für die Abweichung der Hornform wurde das Nachwachsen von Hornstummeln nach einer Enthornung angenommen.

Die Hornpaare der Tiere zeigten innerhalb der Altersgruppen (Tab. 2 in Kapitel 3.1.1.5) eine große Vielfalt bei der Ausprägung der Pneumatisation. Während bei einigen Tieren noch keine Pneumatisation im *Processus cornualis* erkennbar war, durchzog sie bei anderen schon die Hälfte des Horns.

Beispielhaft sollen je vier Röntgenaufnahmen aus den zahlenmäßig stärksten Altersgruppen gezeigt werden: Zum einen Kühe aus der Altersgruppe > 1,5–2 Jahre (Abb. 14), zum anderen Bullen im Alter von > 2–2,5 Jahren (Abb. 15).

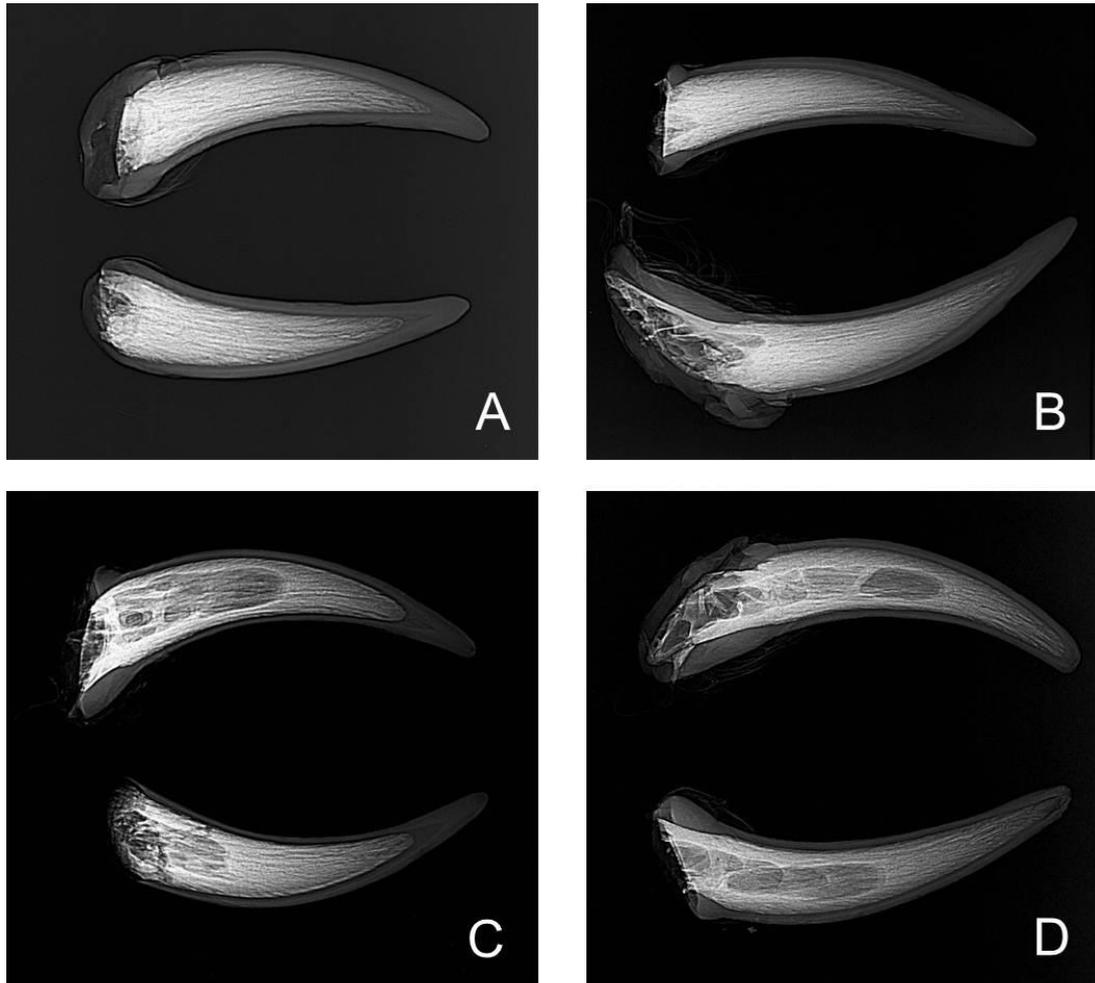


Abbildung 15: Röntgenaufnahmen: Hornpaare von Kühen der Altersgruppe > 1,5–2 Jahre Alter in Monaten: (A/D) 23, (B/C) 22

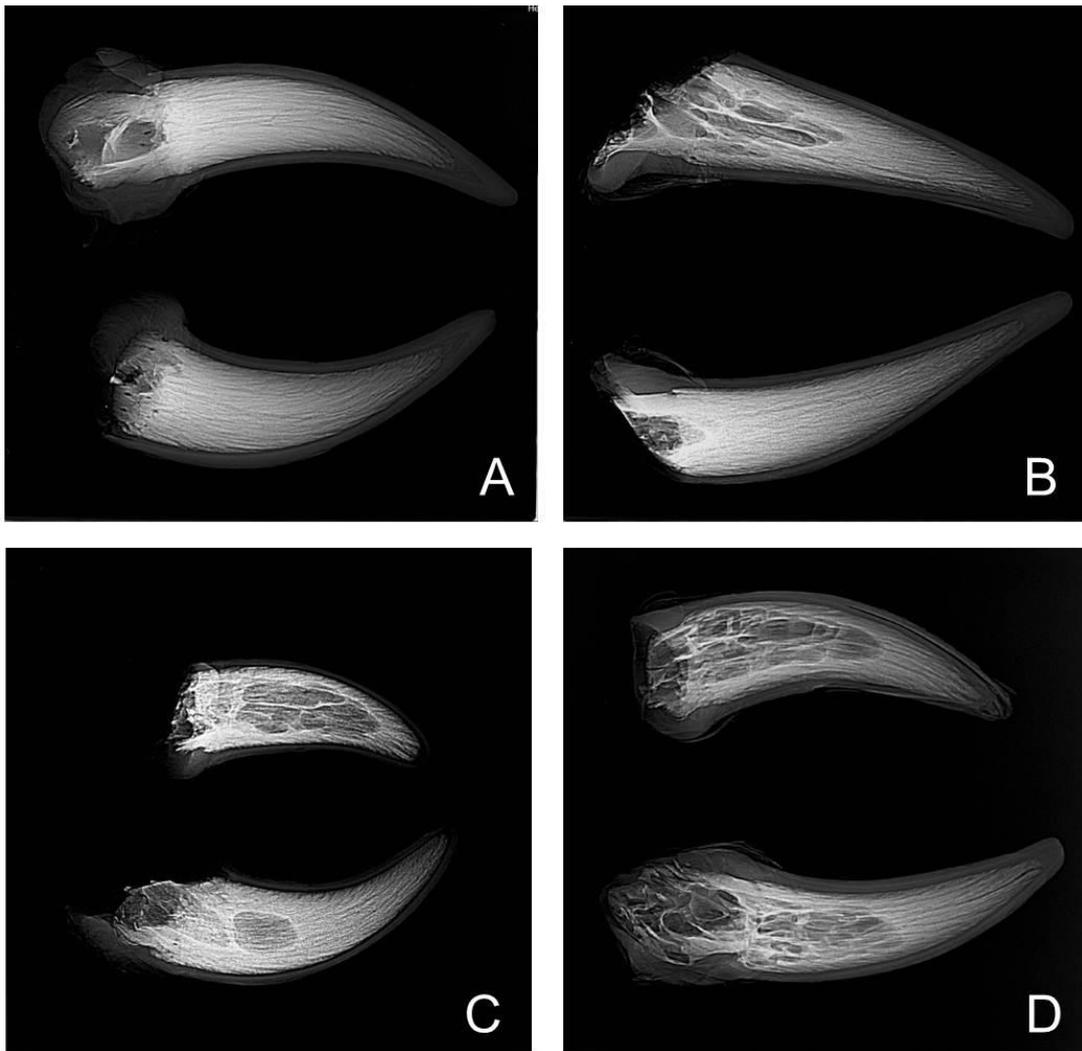


Abbildung 16: Röntgenaufnahmen: Hornpaare von Bullen der Altersgruppe > 2–2,5 Jahren Alter in Monaten:(A) 29,5, (B) 27, (C) 28, 5, (D) 26

Weiterhin konnten in einigen Fällen auch große Unterschiede der Pneumatisationsausprägung zwischen den beiden Hörnern eines Tieres gesehen werden. In Abbildung 17 wird ein Fall mit besonders asymmetrisch verlaufender Pneumatisation dargestellt. Die Trägerin der Hörner war eine Kuh im Alter von 3 Jahren und 9 Monaten.

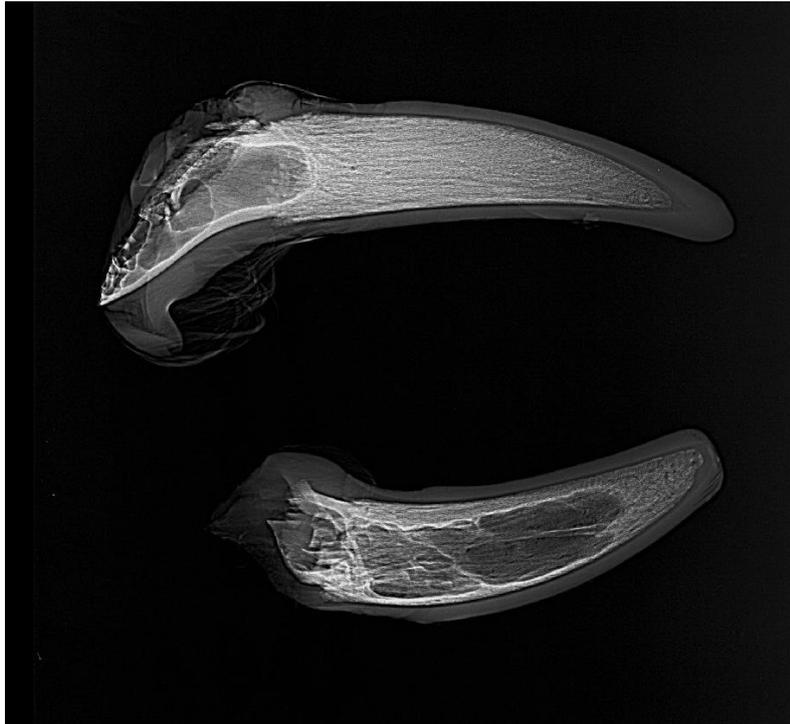


Abbildung 17: Röntgenaufnahme: Asymmetrisch verlaufende Pneumatisation der Hörner Kuh im Alter von 3 Jahren und 9 Monaten

Der Anteil der Tiere innerhalb einer Altersgruppe, bei denen in beiden Hörnern noch keine Pneumatisation zu erkennen war, ist in Tabelle 17 aufgelistet. Die Anzahl der Tiere ohne Pneumatisation innerhalb des *Processus cornualis* sank mit fortschreitendem Alter stetig ab.

Das älteste Tier bei dem die Stirnhöhenschleimhaut noch keines der beiden Hörner erreicht hatte, war eine Kuh im Alter von 3 Jahren und 9 Monaten.

Tabelle 17: Anzahl der Tiere ohne Pneumatisation der Hörner

() %- Anteil der Altersgruppe; – keine Tiere vorhanden

Alter in Jahren	Tiere männlich	Tiere weiblich
1–1,5	3 von 3 (100 %)	1 von 2 (50 %)
> 1,5–2	6 von 17 (35,3 %)	7 von 16 (43,8 %)
> 2–2,5	3 von 9 (33,3 %)	2 von 13 (15,4 %)
> 2,5–3	1 von 7 (14,3 %)	1 von 8 (12,5 %)
> 3–3,5	0 von 1 (0 %)	0 von 3 (0 %)
> 3,5–4	–	1 von 4 (25 %)
> 4–4,5	–	0 von 1 (0 %)

5 DISKUSSION

5.1 Der Weg zum gewählten Tiereset

Zu Beginn der Studie wurden Wackelhörner als qualitatives Merkmal angesehen, ähnlich dem Merkmal Hörner im Bezug zur Hornlosigkeit, welches sich einfach in zwei Varianten einteilen lässt. Auf der einen Seite in die Tiere, die Hörner ausbilden, auf der anderen Seite in die Tiere, die hornlos bleiben (SEICHTER et al., 2012). Beim Merkmal Wackelhörner schien es genauso einfach zu sein. Es sollte genetisch hornlose Tiere geben, die Wackelhörner entwickeln und Tiere, die es nicht tun. So war die anfängliche Herangehensweise an die Sammlung von Probenmaterial entsprechend unkompliziert. Ziel war es, eine möglichst große Anzahl an *SNP*-Genotypen von Bullen und Kühen zu sammeln, die heterozygot hornlos waren und entweder das Merkmal Hornlosigkeit oder das Merkmal Wackelhörner zeigten. Ergänzend wurden auch homozygot hornlose und gehörnte Tiere gesammelt, wenn eine Verwandtschaft zu den Tieren mit ausgewählten Merkmalen bestand.

Der Schwerpunkt der ersten Probensammlung lag auf den Kühen, denn *SNP*-Genotypen männlicher Tiere standen aufgrund der genomischen Selektion in ausreichender Menge zur Verfügung. Bei der Erhebung der Phänotypen wurden die Tiere nur in die beiden Gruppen Wackelhorn-tragend und hornlos eingeteilt, weil davon ausgegangen wurde, dass nur die übergeordneten Phänotypen für die spätere Kartierung von Interesse sein würden.

Um für die geplante *cLDLA*, die unter anderem Stammbäume zur Nachverfolgung von Merkmalen nützt, möglichst verwandte Tiere zu erhalten, wurden *SNP*-Genotypen von Vätern der gesammelten weiblichen Tiere ausgewählt. Einige der *SNP*-Genotypen dieser Bullen waren bereits in der Datenbank der Arbeitsgruppe für Populationsgenomik des Veterinärwissenschaftlichen Departments der LMU München vorhanden. Weitere *SNP*-Genotypen wurden von der Arbeitsgemeinschaft Süddeutscher Rinderzüchter (ASR) und dem Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Züchtung in Bayern e.V. (LKV Bayern) zur Verfügung gestellt. Auch der ent-

sprechende Phänotyp eines Bullen war über dessen Hornloskürzel leicht zugänglich. Bullen mit dem Hornloskürzel Pp wurden der hornlosen Gruppe zugeordnet, während Bullen mit dem Hornloskürzel PS in die Gruppe der Wackelhorn-tragenden Tiere eingeordnet wurden. Es bestand Kenntnis darüber, dass das Hornloskürzel einiger Tiere möglicherweise nicht dem aktuellen Stand entsprach. Um die Angaben zu verifizieren, wurden daher die Namen der Bullen in Verbindung mit den Hornloskürzeln durch den Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch überprüft. Für einen Teil der Tiere konnte damit der Phänotyp abgesichert werden.

Aus den vorhandenen und erhaltenen *SNP*-Genotypen der Bullen und den selbst erstellten *SNP*-Genotypen der Kühe entstand das erste Tiereset. Dieses Set enthielt insgesamt 942 Tiere, unter denen sich auch homozygot hornlose und gehörnte Tiere befanden. Es diente als Basis für die ersten Kartierungen. Diese konnten jedoch kein signifikantes Ergebnis erzielen. In der Folge wurde versucht, über das Herausgreifen einzelner Tiergruppen aus dem ursprünglichen Tiereset eine Verbesserung der Ergebnisse zu erlangen. So wurde ein Tiereset mit nur männlichen und nur weiblichen Tieren zusammengestellt. Ferner wurde ein Tiereset erstellt, indem ausschließlich Tiere mit abgesicherten Phänotypen einbezogen wurden. Aber alle Bemühungen blieben erfolglos. Als letzter Versuch entstand ein Tiereset, das nur Tiere enthielt, die einen bestimmten Bullen in den letzten beiden Generationen ihres Stammbaums führten. Es wurde ein entsprechend hoch frequentierter Bulle gewählt, wodurch ein Tiereset mit 466 seiner Nachkommen erzeugt werden konnte. Die Idee war, dass das bisherige Ausbleiben signifikanter Ergebnisse möglicherweise durch Locusheterogenität verursacht sein könnte, obwohl die *cLDLA* grundsätzlich mit diesem Umstand umgehen kann (z. B. MÜLLER, 2016). Mithilfe nahverwandter Tiere sollte zumindest einer der potenziellen Mutationen nähergekommen werden. Doch auch dieser Versuch scheiterte.

Es wurde Ursachenforschung betrieben und die Sicherheit der Phänotypen der verwendeten Tiere wurde hinterfragt. Weiterhin wurde versucht, mehr Wissen über die verschiedenen Formen von Wackelhörnern zu erlangen und im gleichen Zuge neues Probenmaterial zu gewinnen.

Bei den Phänotyperhebungen von Fleckviehbullen wurde entdeckt, dass es deutlich schwieriger war, Tiere ohne Wackelhörner zu finden, als Tiere mit Wackelhörnern. Teilweise hatten Bullen zwar nur hauchdünne, kaum auffindbare Krusten von gerade einmal 1 cm Durchmesser, aber solche Tiere konnten trotzdem nicht als Wackelhorn-frei eingestuft werden. Im ursprünglichen Tierset waren 479 der 653 heterozygot hornlosen Bullen (73,4 %) Träger des Hornloskürzels Pp und wurden demnach als Wackelhorn-frei eingeordnet. Bei den durchgeführten Phänotypisierungen konnten gerade einmal 16 von 92 Bullen (17,4 %) als Wackelhorn-frei identifiziert werden. Angesichts dieses deutlichen Unterschieds stellte sich die Frage, wie viele der als hornlos angenommenen Bullen des ursprünglichen Tiersets dies auch in Wirklichkeit waren. Tatsächlich kommen Bullen in der Regel in einem Alter von ca. 12 Monaten an eine Besamungsstation und werden zu diesem Zeitpunkt auf vorhandenes Wackelhornwachstum überprüft. Werden keine Wackelhörner festgestellt, wird häufig angenommen, dass ein Tier auch keine Wackelhörner mehr entwickeln wird. Sowohl aufgrund der Literatur (LANGE, 1989; LAMMINGER, 1999) als auch nach den Beobachtungen dieser Studie kann diese Annahme als falsch angesehen werden.

Neben den Wackelhörnern wurde auch das Merkmal Stirnbeulen näher untersucht. Diese knöchernen Zubildungen des Stirnbeins zeigten sich bereits bei vier Wochen alten heterozygot hornlosen Kälbern. In diesem frühen Alter erinnern sie stark an die Hornknospen genetisch gehörnter Kälber. Aus diesem Grund werden heterozygot hornlose Kälber vermutlich auch hin und wieder versehentlich enthornt.

Stirnbeulen sind als ein geringfügiges Wachstum des *Processus cornualis* unter der Haut anzusehen und gehören damit der Grundstruktur eines Horns an. Ausgehend von dieser Hypothese wurden Tiere mit großen Stirnbeulen nicht in die Kartierungsstudie einbezogen. Die Autoren LANGE (1989) und LAMMINGER (1999) hatten die Empfehlung ausgesprochen, Tiere mit großen Stirnbeulen in genetischen Studien in die Gruppe der Wackelhorn-tragenden Tiere einzufügen. Da aber beobachtet werden konnte, dass auch homozygot hornlose Tiere (PP), die keine Wackelhörner entwickeln können, Stirnbeulen zeigen, festigte sich der Entschluss, Tiere mit

großen Stirnbeulen von der Studie auszuschließen. Aufgrund ihrer sporadischen Präsenz in der PP Gruppe wird hiermit auch für künftige Studien eine separate Behandlung von Tieren mit großen Stirnbeulen empfohlen.

Die genannten Beobachtungen führten letztendlich zur Festsetzung der Kriterien aus Kapitel 3.1.3 für die Wahl der Tiere der neu zusammengestellten Tiersets. Die homozygot hornlosen und die gehörnten Tiere wurden schließlich nicht mehr berücksichtigt, da ihr Hornstatus keine Informationen zu den verglichenen Phänotypen beitragen konnte.

5.2 Die Wahl von Methode und Modell

Die *cLDLA* wurde als grundlegende Methode gewählt, da sie zum einen eine gute Kartierungsgenauigkeit bietet (KUNZ, 2016; MÜLLER, 2016) und zum anderen eine geringe Störanfälligkeit aufweist (KUNZ, 2016). Die *SNP*-basierte *GWAS* wurde zu Vergleichszwecken herangezogen.

In den ersten Kartierungen befanden sich Tiere, deren Phänotypen als unterschiedlich sicher bewertet wurden. Dieser Umstand war der Grund für die Einführung einer Gewichtung. Damit wurde versucht, Tiere mit weniger sicheren Phänotypen in der Kartierung belassen zu können, gleichzeitig aber einer möglichen Verfälschung durch falsch zugeordnete Phänotypen entgegenzuwirken.

Die ersten Ergebnisse der *cLDLA* wurden anhand von Haplotypen ausgewertet. Es zeigte sich aber, dass eine Auswertung über Diploypen zu einem deutlich ruhigeren Verlauf der *LRT*-Kurve beitrug, weshalb im Nachfolgenden dieser Form der Vorzug gegeben wurde.

Das Studiendesign war zu Beginn ausschließlich diskontinuierlich modelliert, wie es für ein qualitatives Merkmal üblich ist. Erst als bei der Phänotypisierung der Bullen die große Variation der Wackelhornformen näher beobachtet werden konnte, wurde begonnen, über diese Einschätzung nachzudenken.

Vergleicht man ein Tier, das feine Krusten aufweist, mit einem Tier, das 25 cm lange, voll ausgebildete Wackelhörner trägt, würde man die beiden Ausprägungsformen nicht unbedingt als ein und dasselbe Merkmal beschreiben. So wurde die Idee entwickelt, die Größe der Wackelhörner in die Kartierungen miteinzubeziehen und Wackelhörner damit mehr als quantitatives Merkmal zu betrachten.

Es entstand das kontinuierliche Modell, das dem Charakter von Wackelhörnern besser entspricht, als es das diskontinuierliche Modell tut. Diese Überzeugung basiert auf den umfassenden Beobachtungen der Phänotypen juveniler (s. Kapitel 4.1.4) und adulter Tiere (s. Kapitel 4.1.1).

5.3 Schwierigkeiten und Chancen durch Phänokopien

Bei den ersten Phänotyperhebungen zu Beginn der Studie wurden 32 Tiere gefunden, die zwar phänotypisch Wackelhörner zeigten, aber keine Hornlosmutation besaßen. Aufgrund der hohen Anzahl an Phänokopien wurde für alle Studientiere standardmäßig ein Hornlostest durchgeführt.

Außerdem wurde nach den Ursachen der zum Verwechseln ähnlichen Phänotypen gesucht. Bei einem großen Teil der Tiere stellte sich heraus, dass eine Enthornung stattgefunden hatte. Am Ende blieben aber acht Tiere übrig, die Krusten, wackelnde Stummelhörner oder auch augenscheinlich normale aber wackelnde Hörner unklarer Genese zeigten.

Im ersten Moment wurde über die Möglichkeit eines neuen „Wackelhorn-Typs“ spekuliert, wie es zum Beispiel CAPITAN et al. (2011) mit T2SS im Charolais entdeckt hatten. Während der Studienlaufzeit konnte aber für sieben der acht Tiere gezeigt werden, dass es sich bei ihren Wackelhorn-ähnlichen Hörnern eher um eine Form des verzögerten Hornwachstums handelte. Sechs der sieben Tiere hatten Väter, die weitere Nachkommen mit Wachstumsstörungen der Hörner aufwiesen.

Das siebte Tier zeigte eine phänotypische Besonderheit. Es handelte sich um eine Kuh, die laut Aussage des Landwirts verzögert mit dem Horn-

wachstum begonnen hatte und deren Hörner bis zum Alter von neun Monaten stark wackelten, bevor sie fest mit dem Schädel verwuchsen. Diese Kuh war zum Zeitpunkt der Untersuchung 2 Jahre und 8 Monate alt. Um herauszufinden, ob es sich bei ihren Hörnern um „echte“ Wackelhörner handelte, wurde ein Röntgenbild angefertigt. In Fachkreisen war die gängige Meinung, dass Wackelhörner vollständig knöchern durchbaut und normale Hörner pneumatisiert sind. Somit diente die fehlende Pneumatisation als ein Hilfsmerkmal, das Wackelhörner von normalen Hörnern unterscheidet. Das Röntgenbild zeigte, dass eines der Hörner vollständig knöchern durchbaut war, während das andere Horn sich zu etwa einem Drittel pneumatisiert darstellte. Die Zuordnung der Hörner war anhand des Befundes schwer möglich. Zu diesem Zeitpunkt bestand keine Kenntnis darüber, wie weit die Pneumatisation in einem bestimmten Alter in der Regel fortgeschritten ist. Das Unterscheidungskriterium „fehlende Pneumatisation“ war ohne dieses Wissen für solche Fälle jedoch nicht brauchbar. Die phänotypische Besonderheit dieser Kuh wurde daher zum Anlass genommen, den Pneumatisationsverlauf im Fleckviehhorn näher zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass knöchern durchbaute Hörner auch im Alter von knapp drei Jahren keine Besonderheit darstellen. Eine fehlende Pneumatisation der Hörner kann daher nicht als sicheres Zeichen für Wackelhörner gewertet werden. Zwar wird mit höherem Alter die Wahrscheinlichkeit, knöchern durchbaute Hörner vorzufinden, die keine Wackelhörner sind, immer geringer, doch zeigt der Verlauf der Pneumatisation eine große individuelle Varianz. Diese individuelle Varianz, die auch bereits von DUERST(1926) beschrieben wurde, schließt fehlende Pneumatisation als Unterscheidungskriterium zwischen Wackelhörnern und Hörnern praktisch aus. Einzig der Schluss, dass es sich bei einem pneumatisierten Horn nach derzeitigem Wissensstand nicht um ein Wackelhorn handelt, kann sicher gezogen werden.

Im Fall der Kuh mit den ehemals wackelnden und später fest gewordenen Hörnern scheint es sich demnach eher um „normale“ Hörner und gleichzeitig einen Fall von verzögertem Hornwachstum zu handeln. Zudem haben Erfahrungen aus der Praxis gezeigt, dass auch das häufige Überprüfen und damit Wackeln an einem wachsenden Horn zu einer noch langsameren Verfestigung führen kann.

Die 37 Tiere mit Phänokopien, die aus der ersten Phase der Probennahme stammten, bildeten nur den Anfang. Phänokopien waren während der gesamten Studienlaufzeit wiederkehrende Begleiter. Sie konnten aber in so gut wie allen Fällen den beiden oben genannten Ursachen zugeordnet werden. Bei nur einem weiteren Fall ließ sich für ein wackelndes, hängendes Horn eine alte Verletzung als ursächlich ermitteln.

Die genaue Beobachtung von Phänokopien brachte auch interessante Erkenntnisse. So fiel bei der Nachbildung von Hornstummeln nach Enthornung ein deutlicher Unterschied zwischen den Geschlechtern auf. Weiterhin waren die Verbindungen zwischen heterozygot hornlosen, Wackelhornfreien Bullen und dem verzögerten Hornwachstum von besonderem Interesse.

5.4 Kartierungsstudien zu Wackelhörnern

In der durchgeführten Kartierungsstudie zeigte sich eine mangelnde Anzahl signifikanter Ergebnisse.

In allen Tierset-Modell-Kombinationen, die mit der *cLDLA* berechnet wurden, konnte nur im kontinuierlichen Modell des Tiersets der Bullen ein genomweit signifikanter Wert erreicht werden. Dieser befand sich auf Chromosom 1 an Position 2 251 360 bp nahe der friesischen Hornlosmutation, deren Startposition an der Stelle 1 909 352 bp liegt (ROTHAMMER et al., 2014). Anhand der Diplotypeneffekte ließ sich nachvollziehen, dass das Maximum durch Bullen mit friesischer Hornlosmutation und fehlenden oder nur kleinen Wackelhörnern verursacht wurde. Die Einbeziehung der Hornlosmutation als fixer Effekt im Modell Kf schwächte das Maximum dementsprechend ab. Ob es sich bei der Beobachtung, dass friesische Bullen weniger und kleinere Wackelhornformen ausbilden, um eine grundsätzliche Eigenschaft handelt, lässt sich nicht mit Sicherheit bestimmen. Möglich ist auch, dass in den Familien, aus denen die Fleckvieh-Bullen mit eingeführter friesischer Mutation stammen, vermehrt ein anderer genetischer Faktor die Unterdrückung des Horn- und Wackelhornwachstums verursacht. So

stammten immerhin sieben der neun Wackelhorn-freien Bullen mit friesischer Mutation aus einer Fleckviehfamilie in der vermehrt Tiere mit verzögertem Hornwachstum gefunden wurden (s. Kapitel 4.1.6). Angenommen diese Bullen wären genetisch gehört gewesen, wäre es denkbar, dass sie verzögertes Hornwachstum gezeigt hätten. Weiterhin könnte angenommen werden, dass sie aus dem gleichen Grund mit dem Genotyp Pp keine oder sehr kleine Wackelhörner ausbildeten.

Neben dem signifikanten Maximum auf Chromosom 1 in Modell K des Tiersets 2 konnten in allen Modellen der Tiersets 1 und 2 einige weitere, etwas niedrigere Maxima gefunden werden. Diese schafften es zwar nicht, genomweite Signifikanz zu erreichen, waren aber dennoch plausibel. Die genannten indikativen Ergebnisse könnten durch eine deutlich höhere Tierzahl bestätigt und oder widerrufen werden. Aufgrund der Schwierigkeit, eine größere Zahl geeigneter Bullen zu finden, scheint es einfacher, das Tierset 3 mit zusätzlichen umfangreich phänotypisierten Kühen auszustatten.

Die GWAS bot in den kontinuierlichen Modellen des Tiersets 1 zwei schwach signifikante Maxima auf Chromosom 4 und Chromosom X. Vor allem das Maximum auf Chromosom X wäre bei einer stärkeren Ausprägung oder bei einem zusätzlichen Auffinden in der *cLDLA* von großem Interesse gewesen. Ein X-chromosomaler Erbgang würde eine einfache Erklärung zur geschlechtsabhängigen Verteilung von Größe und Vorkommen der Wackelhörner im Fleckvieh darstellen. Diese Möglichkeit wurde auch bis in jüngste Zeit immer wieder von Autoren als ursächlich in Betracht gezogen (z. B. WIEDEMAR et al., 2014). Da die Maxima der GWAS jedoch ausschließlich in den Modellen K/Kf des Tiersets 1 auftauchten und auch in den Tierset-Modell-Kombinationen der *cLDLA* nicht nachvollzogen werden konnten, fiel die Einschätzung ihrer Bedeutsamkeit eher gering aus. In beiden Fällen waren Assoziationen einzelner SNPs betroffen, dementsprechend wird es sich eher um Scheinassoziationen handeln.

Im Vergleich zu den Studien von ASAI et al. (2004) und TETENS et al. (2015), die je ein signifikantes Ergebnis auf Chromosom 19 finden konnten,

gab es in dieser Studie keine Anhaltspunkte für eine Assoziation an dieser Stelle.

Die Studie von ASAI et al. wurde mittels einer Kopplungskartierung und eines Tiersets, das aus Familien von reinrassigen und Kreuzungstieren einer Vielzahl an Rassen bestand, durchgeführt. Unter den Tieren waren die Rassen Limousin, Fleckvieh, Charolais, Blonde d'Aquitaine, Angus, Hereford und Weißblaue Belgier vertreten.

Ganz anders die Studie von TETENS et al., die eine GWAS durchführten, die nur heterozygot hornlose Fleckviehtiere beinhaltete. Das Tierset dieser Studie war aus 150 Tieren beider Geschlechter zusammengestellt und das Design war diskontinuierlich modelliert. Im Ansatz entsprach die Studie von TETENS et al. damit dem Modell D des Tiersets 1 der vorliegenden Studie. In Tierset 1 mit seinen insgesamt 337 Tieren stammten sogar 63 Tiere ursprünglich aus der Studie von TETENS et al.

Ein Unterschied zwischen den beiden Studien lag aber in dem *SNP*-Chip, der für die Genotypisierung verwendet wurde. TETENS et al. nützten den BovineHD BeadChip anstelle des BovineSNP50 v2 BeadChip von Illumina. Dieser Chip hat mit 777 962 *SNPs* (ILLUMINA INC., 2015) eine deutlich höhere Markerdichte als der BovineSNP50 v2 BeadChip mit nur 54 609 *SNPs* (ILLUMINA INC., 2012).

Es ist daher möglich, dass das Ausbleiben des signifikanten Wertes auf Chromosom 19 in der vorliegenden Studie mit der geringeren Markerdichte in Verbindung zu bringen ist. Genauso können aber auch andere Genfrequenzen in einem größtenteils unterschiedlichen Tierset ausschlaggebend gewesen sein.

Zudem gilt es zu bedenken, dass der signifikante Wert auf Chromosom 19 in der Studie von TETENS et al. auch nur ein niedriges Signifikanzniveau erreichte und dass keine weiteren signifikanten und gleichzeitig als erklärbar gewerteten Maxima auftraten. Es konnten aber weitere deutliche Maxima erkannt werden, die die Signifikanzschwelle nicht erreichten.

TETENS et al. schlussfolgerten, dass es nicht nur einen einzigen Genort für Wackelhörner geben kann, da ihre Studie sonst einen signifikanteren Wert aufgezeigt hätte.

Aufgrund der Beobachtung mehrerer Maxima schlossen sie weiterhin eher auf Locusheterogenität als auf allelische Heterogenität. Unterstützend nannten sie dazu die Studien von CAPITAN et al. (2009; 2011), welche im Charolais Locusheterogenität bei Wackelhörnern feststellen konnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen ähnlich wie in der Studie von TETENS et al. eine Reihe von Maxima, die die Signifikanzschwelle zwar nicht erreichten, aber dennoch nachvollziehbar waren. Der Erklärungsansatz von TETENS et al. ist demnach auch für diese Studie geeignet, aber aufgrund der zusätzlich durchgeführten intensiven Beobachtungen zum Phänotyp wurde eine andere Hypothese entwickelt, welche in Kapitel 5.5 genauer erläutert wird.

5.5 Hypothese zur Genetik von Wackelhörnern im Fleckvieh

In dieser Studie besaßen, ebenso wie in der Studie von WIEDEMAR et al. (2014), alle Tiere, die Wackelhörner zeigten, nur ein Hornlosallel. Hornlosallele unterdrücken das Hornwachstum, wenn auch noch nicht bekannt ist, welche molekularbiologischen Mechanismen diesem Vorgang zugrunde liegen. Sind zwei Hornlosallele vorhanden, lässt sich keine Hornbildung beobachten. Ist hingegen nur ein Hornlosallel vorhanden, können verschiedene Horngebilde auftreten. Möglicherweise schafft es demnach ein alleiniges Hornlosallel nicht, das Hornwachstum eines Tieres vollständig zu unterdrücken, was einer unvollständigen Dominanz entspricht.

Nach dieser Theorie müssten aber alle heterozygot hornlosen Tiere Wackelhörner ausbilden. Warum kommt es also dazu, dass viele dieser Tiere Wackelhorn-frei bleiben und Wackelhorn-tragende Tiere ein ganzes Spektrum von verschieden starken Wackelhörnern zeigen?

Unter den Kühen entwickelten nach dieser Studie 80 % keine Wackelhörner. Auch normale Hörner unterscheiden sich zwischen den Geschlechtern. Kühe haben in der Regel eine weniger breite Hornbasis und damit insgesamt dünnere Hörner als Bullen. Zudem konnte beobachtet werden, dass Kühe nach der Enthornung weniger häufig und wenn, dann weniger große Hornstummel nachbilden. Diese Parallele zwischen den Folgen einer mechanischen Enthornung und der Hornlosigkeit als genetischem Hintergrund zeigt eine scheinbar grundsätzlich schwächere Hornausbildung bei Kühen an. In heterozygot hornlosen Kühen drückt sich diese „Schwäche“ in fehlenden oder vermehrt kleineren (jeweils $P < 0,05$) Wackelhornformen aus.

Unter den Bullen zeigten hingegen 83 % der Tiere Wackelhörner mit einer erstaunlich großen Formvielfalt. Bei den wenigen Tieren, die Wackelhorn-frei blieben, ließ sich zu großen Teilen eine mögliche Ursache ermitteln, die nicht direkt mit Wackelhörnern in Verbindung steht. Sie stammten aus Familien, in denen, selbst bei fehlender Hornlos-Mutation, ein verzögertes Hornwachstum beobachtet wurde. Die Fleckviehzüchter rechnen mit einem oder mehreren das Hornwachstum unterdrückenden genetischen Faktoren in diesen Familien.

Die Gesamtheit der hier zusammengetragenen Beobachtungen lässt Hornwachstum als ein quantitatives Merkmal mit relativ hoher Varianz erscheinen. Es wurde in vorangegangenen Studien gezeigt (DUERST, 1926; SYKES & SYMMONS, 2007), dass fixe Faktoren wie Geschlecht und Alter dieses quantitative Merkmal maßgeblich beeinflussen. Da genau wie in der Studie von WIEDEMAR et al. (2014) Wackelhörner nur in Pp Tieren beobachtet werden konnten, wurde die Hornlosigkeit in Pp Tieren als ein genetisches Merkmal mit unvollständiger Dominanz betrachtet. Das Vorhandensein und die Intensität der Ausbildung von Wackelhörnern (Penetranz) hängt sowohl von quantitativ-genetischen als auch von Umweltfaktoren ab.

Das sind die gleichen Faktoren, die das Wachstum von normalen Hörnern bei pp Tieren beeinflussen. Diese Faktoren sind Geschlecht, Alter, einige Gene (*QTLs*), die die Intensität und den Zeitpunkt des Hornwachstums bedingen sowie zusätzliche Umwelteinflüsse. Die gleichen Faktoren, die spät entwickelte, kleine oder dünne Hörner bei pp Tieren verursachen sind auch für sehr kleine oder nicht vorhandene Wackelhörner bei Pp Tieren verantwortlich. Dieser Einschätzung liegen die statistisch signifikanten differenziellen Beobachtungen in verschiedenen Altersgruppen der männlichen und weiblichen Tiere zugrunde. Vielmehr führt die Einkreuzung eines Hornlosallels in Familien mit verzögertem Hornwachstum zu vollständiger Unterdrückung des Hornwachstums und sogar zu Vertiefungen an den Hornansatzstellen.

Es kommt demnach stets auf die Summe aus positiv und negativ beeinflussenden Faktoren an, die die Größe der Wackelhörner oder Hörner eines jeden Pp oder pp Tieres individuell modellieren.

5.6 Ausblick

Aus den Ergebnissen der Studie ist es nicht möglich, eine sichere Aussage zum genetischen Hintergrund von Wackelhörnern im Fleckvieh zu treffen.

Die vorgestellte Hypothese stellt einen Erklärungsansatz dar, der aus den Beobachtungen der Phänotypen und den Kartierungsergebnissen entstanden ist.

Um diese Hypothese zu überprüfen, bedarf es im ersten Schritt weiterer Forschung zu den molekularen Hintergründen der Hornlosmutationen und allgemein der Hornontogenese.

Im zweiten Schritt könnte eine ähnlich angelegte Kartierung zu Wackelhörnern durchgeführt werden, wie sie in dieser Studie vorliegt, allerdings mit einem deutlich größeren Tiereset. Andernfalls bleibt die statistische Power für eine zuverlässige genetische Kartierung eines komplexen, multifaktoriellen Merkmals zu niedrig. Eine weitere Möglichkeit wäre die Unterteilung des Phänotyps in Gruppen, die nach der Größe der Wackelhörner zusammengestellt sind. So könnte eine qualitativ modellierte Kartierung anfertigt werden, in der zum Beispiel Wackelhorn-freie Tiere, Tiere mit besonders großen Wackelhörnern gegenübergestellt werden und die sich damit auf die Enden der Größenskala beschränkt.

Zum Nachweis, dass Horn- und Wackelhornwachstum von denselben Faktoren beeinflusst werden, würde sich ein paralleler Kartierungsansatz in einer nicht enthornten Kartierungspopulation anbieten. Dazu wäre die Phäno- und Genotypisierung gleichaltriger Tiere nötig. Ein guter Phänotypisierungs-Zeitpunkt könnte beim Fleckvieh zu Beginn der Hornentwicklung, zwischen dem vierten und sechsten Lebensmonat, liegen. In dieser Zeit wäre auch das verzögerte Hornwachstum noch deutlich zu erkennen.

Von größter Bedeutung bleibt bei allen weiteren Kartierungsansätzen die Richtigkeit der verwendeten Phänotypen, die sorgsam zu prüfen ist. Dazu sollten nach Möglichkeit die hier präsentierten Erfahrungen und Hypothesen berücksichtigt werden.

Der Weg bis zur vollständigen Aufklärung der genetischen Hintergründe von Wackelhorn-tragenden Tieren ist möglicherweise noch ein weiter. Wackelhörner selbst werden aber nach dem derzeitigen und in naher Zukunft erwarteten Anstieg durch die Ausbreitung der Hornloszucht und die stetige Zunahme der Anzahl homozygot hornloser Fleckviehtiere wieder abnehmen. Aufgrund ihrer hohen Prävalenz in männlichen Tieren lassen sie sich züchterisch jedoch nicht umgehen und werden die Hornloszucht noch über einen gewissen Zeitraum begleiten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Erstellung einer informativen Proben- und Datenstruktur und deren Anwendung in einer Kartierungsstudie zu Wackelhörnern in der Fleckviehpopulation. Dazu wurde umfangreiches Probenmaterial gesammelt und gleichzeitig eine intensive Untersuchung der Phänotypen heterozygot hornloser Tiere durchgeführt. Die Phänotypisierung und Beprobung sowohl juveniler als auch adulter Tiere beider Geschlechter fand auf Kälbermärkten, in privaten Fleckviehzuchtbetrieben, in Besamungsstationen und bei der Landesanstalt für Landwirtschaft in Bayern statt. Für die Kartierungsstudie wurde zusätzliches Datenmaterial aus Deutschland und der Schweiz verwendet.

Bei Vorkommen und Größe des Phänotyps Wackelhorn wurden signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt. Pp Bullen hatten in einer Stichprobe mit 92 Tieren im Alter von über 1,5 Jahren in 83 % der Fälle Wackelhörner. In Pp Kühen von über 2,5 Jahren und einer Stichprobengröße von 209 Tieren bildeten hingegen nur 20 % der Tiere Wackelhörner aus. Unter den männlichen Tieren wurden zudem häufiger größere Wackelhornformen beobachtet als unter den weiblichen Tieren.

Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl Wackelhorn-freier Tiere in Bezug auf die Hornlosmutation festgestellt werden. Tiere mit friesischer Hornlosmutation zeigten weniger und kleinere Wackelhornformen. Bei diesem Ergebnis ist jedoch aufgrund der geringen Zahl an Linien, in die die friesische Hornlosmutation im Fleckvieh eingekreuzt wurde, auch an Populationsstratifikation zu denken.

Während der Phänotypisierungen wurde eine weitere Besonderheit in sieben Wackelhorn-freien Bullen entdeckt. Sie zeigten an den Hornansatzstellen ein- oder beidseitig Vertiefungen am Stirnbein. Fünf der Tiere waren eng verwandt und stammten aus einer Familie, in der bei pp Tieren immer wieder verzögertes Hornwachstum beobachtet werden konnte. Ein weiterer Bulle hatte ebenfalls einen Vorfahren, der aus dieser Familie stammte, im Pedigree.

Bei einer generellen Betrachtung der kleinen Gruppe der Wackelhorn-freien Bullen fiel auf, dass 10 von 16 Tieren aus zwei unterschiedlichen Familien mit verzögertem Hornwachstum stammten.

Neben den Wackelhörnern heterozygot hornloser Tiere wurden eine Reihe von Phänokopien beobachtet, die durch Enthornung, Verletzung oder durch verzögertes Hornwachstum hervorgerufen waren. Zur Unterscheidung von Wackelhörnern unklarer Genese und normalen Hörnern wird in Fachkreisen häufig das Hilfsmerkmal der Pneumatisation herangezogen. Wackelhörner sind im Vergleich zu normalen Hörnern vollständig knöchern durchbaut. Um das Merkmal „fehlende Pneumatisation“ auf seine Anwendbarkeit im Fleckvieh zu überprüfen, erfolgte eine röntgenologische Untersuchung von 93 Fleckvieh-Hornpaaren, die von pp Tieren beider Geschlechter im Alter zwischen 1–4,5 Jahren stammten. Das Ergebnis der Untersuchung zeigte, dass der Pneumatisationsverlauf eine große individuelle Vielfalt aufweist. So war das älteste pp Tier mit vollständig knöchern durchbauten Hörnern 3 Jahre und 9 Monate alt. Demzufolge ist ein Fehlen der Pneumatisation im Fleckvieh bei Tieren in jüngerem Alter nicht zur Abgrenzung zwischen normalen Hörnern und Wackelhörnern geeignet.

Für die Kartierungsstudie wurden ausschließlich Pp Tiere ausgewählt, von denen das Alter zum Zeitpunkt der Phänotypisierung und die Art der Hornlosmutation bekannt waren. Von Wackelhorn-tragenden Tieren musste zusätzlich Kenntnis über die Wackelhorngröße bestehen. Wackelhorn-freie Tiere wurden erst ab einem Mindestalter von 1,5 Jahren bei der Phänotypisierung für die Studie verwendet, um die Wahrscheinlichkeit einer nachträglichen Wackelhornausbildung möglichst gering zu halten. Weiterhin sollten Wackelhorn-freie Tiere mit großen Stirnbeulen ausgeschlossen werden. Aufgrund der geringen Anzahl Wackelhorn-freier Bullen konnte dieses Vorhaben jedoch nur bei Wackelhorn-freien Kühen umgesetzt werden. Basierend auf den genannten Voraussetzungen entstand letztendlich ein Tierset mit 337 Tieren. Davon waren 170 Tiere männlich und 167 Tiere weiblich.

Die Kartierungen wurden für das gemischtgeschlechtliche Tierset sowie für Bullen und Kühe separat durchgeführt. Als grundlegende Methode wurde dazu die auf Haplotypen basierende, kombinierte Kopplungsungleichgewichts- und Kopplungsanalyse (*cLDLA*) verwendet. Ergänzend fanden *SNP*-basierte Genomweite Assoziationsstudien (*GWAS*) Anwendung. Es wurden zwei unterschiedliche Kartierungsansätze, die einem kontinuierlich und einem diskontinuierlich modellierten Design entsprachen, erstellt. Das kontinuierlich modellierte Design entstand aufgrund der Beobachtung einer unerwartet großen Variabilität von Wackelhornformen. So wurde das Merkmal Wackelhorn im Gegensatz zur gängigen Auffassung nicht mehr als qualitatives, sondern eher als quantitatives Merkmal gesehen.

Die Kartierungen ergaben ein genomweit signifikantes Signal auf Chromosom 1 in der Nähe des *Polled* Locus und einige weitere indikative Werte auf verschiedenen Chromosomen. Die indikativen Ergebnisse der einzelnen Tiersets könnten durch Sammeln von weiteren umfangreich phänotypisierten Rindern entweder bestätigt oder widerrufen werden. Dies scheint leichter umsetzbar für das Tierset der Pp Kühe. Ein signifikantes Maximum auf *BTA19*, wie es in vorangegangenen Studien gesehen wurde, blieb aus.

Anhand der Kartierungsergebnisse in Verbindung mit den Beobachtungen zum Phänotyp konnten Parallelen zwischen Wackelhornwachstum und Hornwachstum erkannt werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Wackelhörner genau wie Hörner von vielen Faktoren wie Alter, Geschlecht, mehreren Genen und der Umwelt beeinflusst werden. Aufgrund der Tatsache, dass Wackelhörner ausschließlich bei heterozygot, nicht aber bei homozygot hornlosen Tieren vorkommen, wird zudem von einer unvollständigen Unterdrückung des Hornwachstums durch ein alleiniges Hornlosallel ausgegangen. Wackelhörner würden demnach aus einem unvollständig dominanten Erbgang resultieren, während ihr Vorhandensein und ihre Variabilität durch den multifaktoriellen Charakter gesteuert wären.

7 SUMMARY

This thesis aimed to build an informative sample set and data structure for a mapping study on scurs in Fleckvieh cattle. Extensive sampling and an intensive investigation of phenotypes of heterozygous polled juvenile and adult cattle of both sexes was conducted at calf sales, on private Simmental breeding farms, artificial insemination centres and the Bavarian State Research Center for Agriculture (LfL). For the mapping study, additional data and material from Germany and Switzerland were used.

With regard to appearance and size of the scurs, significant differences between the sexes were observed. In a sample of 92 Pp bulls older than 1,5 years, 83 % of the animals had scurs. However, in a sample of 209 Pp cows older than 2,5 years, only 20 % of the animals had developed scurs. Moreover, males frequently had bigger scurs than females.

Furthermore, with regard to the type of the polled mutation, significant differences between the numbers of animals without scurs were observed. Animals carrying the Friesian polled mutation showed less and smaller scurs than animals carrying the Celtic polled mutation. Because of the small number of Fleckvieh breeding lines into which the Friesian mutation has been introgressed, population stratification has to be kept in mind.

During phenotyping, an additional specific characteristic was discovered in seven polled bulls without scurs. They showed a depression at the horn site on one or both sides of the frontal bone. Five of the animals were closely related and originated from a family with frequent cases of delayed horn growth in pp animals. Another bull also had an ancestor from this family in its pedigree.

A general investigation of the small group of scurs-free bulls showed that ten out of 16 bulls came from families with a history of delayed horn growth.

Besides scurs in heterozygous polled animals, different kinds of phenocopies were observed that stemmed from disbudding, injuries or delayed horn growth. To clearly differentiate between scurs of unknown genesis and

normal horns, the degree of pneumatization is often used as an auxiliary characteristic – while normal horns show pneumatization, scurs are solid. To test for the applicability of this characteristic in Fleckvieh cattle, a radiographical study was conducted on 93 pairs of horns of pp animals of both sexes between 1 and 4,5 years of age. This study showed great individual variation in the degree of pneumatization. The oldest pp animal with solid horns was 3 years and 9 months old. Consequently, the absence of pneumatization cannot be used as a differentiation criterion for scurs and normal horns in young Fleckvieh cattle.

For the mapping study, only Pp animals with known age at phenotyping and known type of the polled mutation were used. In animals with scurs, information about the size of the scurs was mandatory. Scurs-free animals below an age of 1,5 years at phenotyping were excluded from the study to keep the risk of late scurs development as low as possible. Furthermore, scurs-free animals with big bumps at the forehead were to be excluded from the study; however, because of the very low number of scurs-free bulls, this was only possible for scurs-free cows. Taking all these requirements into account, a set of 337 animals (170 male, 167 female) was assembled for the mapping study.

Mappings were conducted in a set containing both males and females as well as in separate sets for bulls and cows. The haplotype-based combined linkage disequilibrium and linkage analysis (*cLDLA*) method served as the basic mapping method, while SNP-based genome-wide association studies (*GWAS*) were additionally conducted. Two different mapping approaches that were equal to a continuously and a discontinuously modeled design were used. The discontinuously modeled design was due to the observation of an unexpectedly large variability in the scurs phenotype. Therefore, contrary to the common opinion, scurs were seen more as a quantitative than a qualitative characteristic.

The mappings resulted in a genome-wide significant signal on *BTA1* close to the *Polled* locus and additional indicative signals on other chromosomes. These indicative results in certain animal sets could be confirmed or reject-

ed by additional samplings of extensively phenotyped cattle. An extension of the animal set currently seems more feasible for the set of Pp cows. The significant maximum on *BTA19* that was found in earlier studies could not be confirmed.

Combining the mapping results with the phenotypic observations, parallels between scurs and horn growth were observed. This resulted in the hypothesis that scurs development, similar to horn development, is influenced by numerous factors like age, sex, several genes and the environment. Due to the fact that scurs appear only in heterozygous but not in homozygous polled animals, it is assumed that a single polled allele is not able to completely suppress horn growth. Consequently, scurs could be seen as the result of an incomplete dominant inheritance, while their form and variability is regulated multifactorially.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Allais-Bonnet A., Grohs C., Medugorac I., Krebs S., Djari A., Graf A., Fritz S., Seichter D., Baur A., Russ I., Bouet S., Rothhammer S., Wahlberg P., Esquerre D., Hoze C., Boussaha M., Weiss B., Thepot D., Fouilloux M.N., Rossignol M.N., van Marle-Koster E., Hreietharsdottir G.E., Barbey S., Dozias D., Cobo E., Reverse P., Catros O., Marchand J.L., Soulas P., Roy P., Marquant-Leguienne B., Le Bourhis D., Clement L., Salas-Cortes L., Venot E., Pannetier M., Phocas F., Klopp C., Rocha D., Fouchet M., Journaux L., Bernard-Capel C., Ponsart C., Eggen A., Blum H., Gallard Y., Boichard D., Pailhoux E., Capitan A. (2013)** Novel insights into the bovine polled phenotype and horn ontogenesis in Bovidae. PLoS One; 8: e63512.
- Almasy L., Williams J.T., Dyer T.D., Blangero J. (1999)** Quantitative trait locus detection using combined linkage/disequilibrium analysis. Genetic epidemiology; 17: 31-6.
- Andersson L. (2001)** Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. Nat Rev Genet; 2: 130-8.
- Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e.V. (2017)** Erstbesamungen und meistgenutzte Bullen 2016. <http://www.adr-web.de/meldungen/erstbesamungen-und-meisteingesetzte-bullen-2016.html> Abgerufen am 12. Juni 2017.
- Arbeitsgemeinschaft Süddeutscher Rinderzucht- und Besamungsstationen e.V., Centrale Marketing-Gesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft mbH. (2007)** Deutsches Fleckvieh. C. Kohlmann Druck & Verlag, Bad Lauterberg
- Arias J.A., Keehan M., Fisher P., Coppieters W., Spelman R. (2009)** A high density linkage map of the bovine genome. BMC Genet; 10: 18.
- Aristoteles, Aubert H., Wimmer F. (1868a)** 1. Aristotelus Histoira perizōōn. Engelmann, Leipzig
- Aristoteles, Aubert H., Wimmer F. (1868b)** 2. Aristotelus Histoira perizōōn. Engelmann, Leipzig
- Asai M., Berryere T.G., Schmutz S.M. (2004)** The scurs locus in cattle maps to bovine chromosome 19. Anim Genet; 35: 34-9.
- Bader A. (2001)** Molekulargenetische Untersuchungen zur Hornlosigkeit beim Rind. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (2016)** Zucht auf Hornlosigkeit beim Fleckvieh. <http://www.Lfl.Bayern.-De/itz/rind/025175/> Abgerufen am 16. März 2017.

- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (2017)** Tierwohl: Hornloszucht mit System. <https://www.lfl.bayern.de/itz/rind/101343-/index.php> Abgerufen am 28. Juli 2017.
- Boulanger L., Pannetier M., Gall L., Allais-Bonnet A., Elzaïat M., Le Bourhis D., Daniel N., Richard C., Cotinot C., Ghyselinck N.B., Pailhous E. (2014)** FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat. *Curr Biol*; 24: 404-8.
- Bouquet A., Venot E., Laloe D., Forabosco F., Fogh A., Pabiou T., Moore K., Eriksson J.A., Renand G., Phocas F. (2011)** Genetic structure of the European Charolais and Limousin cattle metapopulations using pedigree analyses. *J Anim Sci*; 89: 1719-30.
- Brem G., Karnbaum B., Rosenberg E. (1982)** Zur Vererbung der Hornlosigkeit beim Fleckvieh. In: Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch: 688-95. Verlag Kastner, Wolnzach
- Bro-Jørgensen J. (2007)** The intensity of sexual selection predicts weapon size in male bovids. *Evolution*; 61: 1316-26.
- Browning B.L., Browning S.R. (2009)** A Unified Approach to Genotype Imputation and Haplotype-Phase Inference for Large Data Sets of Trios and Unrelated Individuals. *Am J Hum Genet*; 84: 210-23.
- Browning S.R., Browning B.L. (2007)** Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. *Am J Hum Genet*; 81: 1084-97.
- Browning S.R., Browning B.L. (2011)** Haplotype phasing: existing methods and new developments. *Nat Rev Genet*; 12: 703-14.
- Bruner K.A., Van Camp S.D. (1992)** Assessment of the reproductive system of the male ruminant. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 8: 331-45.
- Budras K., Wünsche A. (2002)** Atlas der Anatomie des Rindes. 1. Aufl. Verlag Schlütersche GmbH & Co. KG Verlag und Druckerei, Hannover
- Burton P.R., Tobin M.D., Hopper J.L. (2005)** Key concepts in genetic epidemiology. *The Lancet*; 366: 941-51.
- Bush W.S., Moore J.H. (2012)** Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLOS Computational Biology*; 8: e1002822.
- Capitan A., Grohs C., Gautier M., Eggen A. (2009)** The scurs inheritance: new insights from the French Charolais breed. *BMC Genet*; 10: 33.
- Capitan A., Grohs C., Weiss B., Rossignol M.N., Reverse P., Eggen A. (2011)** A newly described bovine type 2 scurs syndrome segregates with a frame-shift mutation in TWIST1. *PLoS One*; 6: e22242.

- Capitan A., Allais-Bonnet A., Pinton A., Marquant-Le Guienne B., Le Bourhis D., Grohs C., Bouet S., Clement L., Salas-Cortes L., Venot E., Chaffaux S., Weiss B., Delpeuch A., Noe G., Rossignol M.N., Barbey S., Dozias D., Cobo E., Barasc H., Auguste A., Pannetier M., Deloche M.C., Lhuillier E., Bouchez O., Esquerre D., Salin G., Klopp C., Donnadiou C., Chantry-Darmon C., Hayes H., Gallard Y., Ponsart C., Boichard D., Pailhoux E. (2012)** A 3.7 Mb deletion encompassing ZEB2 causes a novel polled and multisystemic syndrome in the progeny of a somatic mosaic bull. *PLoS One*; 7: e49084.
- Caray D., des Roches A.D., Frouja S., Andanson S., Veissier I. (2015)** Hot-iron disbudding: stress responses and behavior of 1-and 4-week-old calves receiving anti-inflammatory analgesia without or with sedation using xylazine. *Livestock Science*; 179: 22-8.
- Carlson C.S., Eberle M.A., Kruglyak L., Nickerson D.A. (2004)** Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature*; 429: 446-52.
- Carlson D.F., Lancto C.A., Zang B., Kim E.S., Walton M., Oldeschulte D. (2016)** Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotechnol*; 34: 479-81.
- Castelló J.R., Groves C., Huffman B. (2016)** *Bovids of the World*. 1. Aufl. Princeton University Press, Princeton [u.a.]
- Cervantes-Barragan D.E., Villarroel C.E., Medrano-Hernandez A., Duran-McKinster C., Bosch-Canto V., Del-Castillo V., Nazarenko I., Yang A., Desnick R.J. (2011)** Setleis syndrome in Mexican-Nahua sibs due to a homozygous TWIST2 frameshift mutation and partial expression in heterozygotes: review of the focal facial dermal dysplasias and subtype reclassification. *J Med Genet*; 48: 716-20.
- Chen Z.-F., Behringer R.R. (1995)** Twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes & development*; 9: 686-99.
- Collins A. (2009)** Allelic Association: Linkage Disequilibrium Structure and Gene Mapping. *Molecular Biotechnology*; 41: 83-9.
- Cozzi G., Gottardo F., Brscic M., Contiero B., Irrgang N., Knierim U., Pentelescu O., Windig J.J., Mirabito L., Eveillard F.K., Dockes A.C., Veissier I., Velarde A., Fuentes C., Dalmau A., Winckler C. (2015)** Dehorning of cattle in the EU Member States: A quantitative survey of the current practices. *Livestock Science*; 179: 4-11.
- Davis E.B., Brakora K.A., Stilson K.T. (2014)** Evolution, development and functional role of horns in cattle. In: *Ecology, Evolution and Behaviour of Wild Cattle: Implications for Conservation*. Melletti M, Burton J: 72-82. 1. Aufl. Cambridge University Press, Cambridge

- Dirksen G. (2006)** Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. 5. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Dove W.F. (1935)** The physiology of horn growth: a study of the morphogenesis, the interaction of tissues, and the evolutionary processes of a Mendelian recessive character by means of transplantation of tissues. *Journal of Experimental Zoology*; 69: 347-405.
- Driesch A.v.d., Peters J. (2003)** Geschichte der Tiermedizin. 2. Aufl. Schattauer, Stuttgart [u.a.]
- Drögemüller C., Wöhlke A., Mömke S., Distl O. (2005)** Fine mapping of the polled locus to a 1-Mb region on bovine Chromosome 1q12. *Mammalian Genome*; 16: 613-20.
- Duerst J.U. (1926)** Das Horn der Cavicornia. 1. Aufl. Fretz, Zürich
- Fang J., Dagenais S.L., Erickson R.P., Arlt M.F., Glynn M.W., Gorski J.L., Seaver L.H., Glover T.W. (2000)** Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. *Am J Hum Genet*; 67: 1382-8.
- Flint J., Mott R. (2001)** Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat Rev Genet*; 2: 437-45.
- Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Verein für biologisch-dynamische Landwirtschaft, Demeter e.V., Bioland Beratung GmbH, IBLA Luxemburg (2016)** Die Bedeutung der Hörner für die Kuh. 2. Aufl. , <http://ibla.lu/res/uploads/2016/06/1662-kuhorn.pdf> Abgerufen am 15. Januar 2017.
- Fries R., Pausch H. (2011)** Individuelle Genomsequenzierung von Nutztieren – auf dem Weg zur genomischen Selektion 2.0. *Züchtungskunde*; 83: 371-81.
- Frommlet F., Bogdan M., Ramsey D. (2016)** Phenotypes and Genotypes. 1. Aufl. Springer-Verlag London, London
- Geldermann H. (1975)** Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. *Theor Appl Genet*; 46: 319-30.
- Geldermann H. (2005)** Tier-Biotechnologie. 1. Aufl. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- GeneControl GmbH (2016)** Verbindliche Prüfmethode- Nachweis von Genvarianten am POLLED-Lokus mittels PCR in Blut-, Sperma-, Gewebe-, und Haarwurzelpollen vom Rind

- Georges M., Drinkwater R., King T., Mishra A., Moore S.S., Nielsen D., Sargeant L.S., Sorensen A., Steele M.R., Zhao X. (1993)** Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in *Bos taurus*. *Nat Genet*; 4: 206-10.
- Gilmour A.R., Goegel B.J., Culli B.R., R. T. (2009)** ASReml User Guide (Release 3.0). <https://www.vsnl.co.uk/downloads/asreml/release3-/UserGuide.pdf> Abgerufen am 24. Mai 2017.
- 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: 381-91.
- Götz K.U., Luntz B., Robeis J., Edel C., Emmerling R., Buitkamp J., Anzenberger H., Duda J. (2015)** Polled Fleckvieh (Simmental) cattle – current state of the breeding program. *Livest Sci*; 179: 80-5.
- Graw J. (2015)** Genetik. 6. Aufl. Springer Spektrum, Berlin [u.a.]
- Griffiths A.J. (2005)** An introduction to genetic analysis. 8. Aufl. Freeman, New York [u.a.]
- Gunderson K.L., Steemers F.J., Lee G., Mendoza L.G., Chee M.S. (2005)** A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet*; 37: 549-54.
- Illumina Inc. (2011)** Genome-Wide DNA Analysis BeadChips. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing-/documents/products/brochures/datasheet_omni_whole-genome_arrays.pdf Abgerufen am 21. Februar 2017.
- Illumina Inc. (2012)** Data Sheet: DNA Analysis, Bovine SNP50 Genotyping BeadChip. https://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovine_snp50.pdf Abgerufen am 22. September 2016.
- Illumina Inc. (2015)** Datasheet: Agrigenomics, Bovine HD Genotyping BeadChip. http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf Abgerufen am 6. Februar 2018.
- Knierim U., Irrgang N., Roth B.A. (2015)** To be or not to be horned—Consequences in cattle. *Livestock Science*; 179: 29-37.
- König H.E., Liebich H.-G. (2014)** Anatomie der Haussäugetiere. 6. Aufl. Schattauer, Stuttgart
- Kruglyak L. (1997)** What Is Significant in Whole-Genome Linkage Disequilibrium Studies? *Am J Hum Genet*; 61: 810-2.
- Kunz E. (2016)** Feinkartierung und Kandidatengenanalyse des Weaver-Syndroms im Braunvieh. Inaugural-Dissertation, LMU München

- Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (2016)** Tierschutzindikatoren: Leitfaden für die Praxis- Rind https://www.ktbl.de/fileadmin/user_upload/Allgemeines/Download/Tierwohl/Leitfaden_Indikatoren_Aufzuchtkalb.pdf Abgerufen am 22. Februar 2017.
- Lamminger A. (1999)** Beziehungen zwischen der Hornlosigkeit und den Zuchtzielmerkmalen beim Deutschen Fleckvieh. Inaugural-Dissertation, LMU-München
- Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. (2017)** http://www.lkv.bayern.de/lkv/medien-/Jahresberichte/mlp_16_kb.pdf Abgerufen am 12. Dezember 2017.
- Lange H. (1989)** Untersuchungen über Hornlosigkeit und Kopfform beim deutschen Fleckvieh. Inaugural-Dissertation, LMU München
- Lee S.H., van der Werf J.H. (2004)** The efficiency of designs for fine-mapping of quantitative trait loci using combined linkage disequilibrium and linkage. *Genet Sel Evol*; 36: 145.
- Lee S.H., Van der Werf J.H.J. (2006)** Using Dominance Relationship Coefficients Based on Linkage Disequilibrium and Linkage With a General Complex Pedigree to Increase Mapping Resolution. *Genetics*; 174: 1009-16.
- Long C.R., Gregory K.E. (1978)** Inheritance of the Horned, Scurred, and Polled Condition in Cattle. *Journal of Heredity*; 69: 395-400.
- Lühken G., Krebs S., Rothammer S., Küpper J., Mioč B., Russ I., Medugorac I. (2016)** The 1.78-kb insertion in the 3'-untranslated region of RXFP2 does not segregate with horn status in sheep breeds with variable horn status. *Genetics Selection Evolution*; 48: 78.
- Lush J.L. (1949)** Heritability of quantitative characters in farm animals. *Hereditas*; 35: 356-75.
- Ma L., O'Connell J.R., VanRaden P.M., Shen B., Padhi A., Sun C., Bickhart D.M., Cole J.B., Null D.J., Liu G.E., Da Y., Wiggans G.R. (2015)** Cattle Sex-Specific Recombination and Genetic Control from a Large Pedigree Analysis. *PLOS Genetics*; 11: e1005387.
- March R.E. (1999)** Gene mapping by linkage and association analysis. *Molecular Biotechnology*; 13: 113-22.
- Mariasegaram M., Reverter A., Barris W., Lehnert S.A., Dalrymple B., Prayaga K. (2010)** Transcription profiling provides insights into gene pathways involved in horn and scurs development in cattle. *BMC Genomics*; 11: 370.

- Matukumalli L.K., Lawley C.T., Schnabel R.D., Taylor J.F., Allan M.F., Heaton M.P., O'Connell J., Moore S.S., Smith T.P., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P. (2009)** Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS One*; 4: e5350.
- Medugorac I., Seichter D., Graf A., Russ I., Blum H., Gopel K.H., Rothammer S., Forster M., Krebs S. (2012)** Bovine polledness--an autosomal dominant trait with allelic heterogeneity. *PLoS One*; 7: e39477.
- Medugorac I., Graf A., Grohs C., Rothammer S., Zagdsuren Y., Gladyr E., Zinovieva N., Barbieri J., Seichter D., Russ I., Eggen A., Hellenthal G., Brem G., Blum H., Krebs S., Capitan A. (2017)** Whole-genome analysis of introgressive hybridization and characterization of the bovine legacy of Mongolian yaks. *Nat Genet*; 49: 470-5.
- Meuwissen T.H., Goddard M.E. (2000)** Fine mapping of quantitative trait loci using linkage disequilibria with closely linked marker loci. *Genetics*; 155: 421-30.
- Meuwissen T.H.E., Hayes B.J., Goddard M.E. (2001)** Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*; 157
- Meuwissen T.H.E., Karlsen A., Lien S., Olsaker I., Goddard M.E. (2002)** Fine mapping of a quantitative trait locus for twinning rate using combined linkage and linkage disequilibrium mapping. *Genetics*; 161: 373-9.
- Müller M.-P. (2016)** Molekular- und populationsgenetische Untersuchungen zur Fruchtbarkeit der Rinderrasse Holstein-Friesian. Inaugural-Dissertation, LMU München
- Nachman M.W. (2002)** Variation in recombination rate across the genome: evidence and implications. *Current Opinion in Genetics & Development*; 12: 657-63.
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (2004)** Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III: Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane. 4. Aufl. Parey Verlag, Stuttgart
- Nicolazzi E.L., Picciolini M., Strozzi F., Schnabel R.D., Lawley C., Pirani A., Brew F., Stella A. (2014)** SNPchiMp: a database to disentangle the SNPchip jungle in bovine livestock. *BMC Genomics*; 15: 123.
- Olsen H., Lien S., Svendsen M., Nilsen H., Roseth A., Opsal M.A., Meuwissen T. (2004)** Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. *Journal of Dairy Science*; 87: 690-8.

- Olsen H.G., Gomez-Raya L., Våge D.I., Olsaker I., Klungland H., Svendsen M., Ådnøy T., Sabry A., Klemetsdal G., Schulman N., Krämer W., Thaller G., Rønningen K., Lien S. (2002)** A Genome Scan for Quantitative Trait Loci Affecting Milk Production in Norwegian Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*; 85: 3124-30.
- Olsen H.G., Lien S., Gautier M., Nilsen H., Roseth A., Berg P.R., Sundsaasen K.K., Svendsen M., Meuwissen T.H.E. (2005)** Mapping of a Milk Production Quantitative Trait Locus to a 420-kb Region on Bovine Chromosome 6. *Genetics*; 169: 275-83.
- Orlando L. (2015)** The first aurochs genome reveals the breeding history of British and European cattle. *Genome Biology*; 16: 225.
- Panofka T. (1851)** Die griechischen Trinkhörner und ihre Verzierungen. 1. Aufl. Druckerei der königlichen Akademie der Wissenschaften, Berlin
- Picard K., Thomas D.W., Festa-Bianchet M., Belleville F., Laneville A. (1999)** Differences in the thermal conductance of tropical and temperate bovid horns. *Écoscience*; 6: 148-58.
- Powell J.E., Visscher P.M., Goddard M.E. (2010)** Reconciling the analysis of IBD and IBS in complex trait studies. *Nat Rev Genet*; 11: 800-5.
- Prayaga K.C. (2007)** Genetic options to replace dehorning in beef cattle—a review*. *Australian Journal of Agricultural Research*; 58: 1-8.
- Pritchard J.K., Rosenberg N.A. (1999)** Use of Unlinked Genetic Markers to Detect Population Stratification in Association Studies. *Am J Hum Genet*; 65: 220-8.
- Pulst S.M. (1999)** Genetic linkage analysis. *Archives of Neurology*; 56: 667-72.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira Manuel A R., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker Paul I W., Daly Mark J., Sham Pak C. (2007)** PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am J Hum Genet*; 81: 559-75.
- QIAGEN (2014)** QIAamp DNA Micro Handbook. <https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=085e6418-1ec0-45f2-89eb-62705f86f963&lang=en> Abgerufen am 11. April 2017.
- Rice L.E. (1987)** Reproductive problems of beef bulls. *Agri-Practice*; 8: 22-7.
- Robeis J., Luntz B. (2013)** Hornlostest schafft Fakten. In: *Rinderzucht Fleckvieh*. 4: 32-3.
- Robeis J., Luntz B. (2017)** Zusätzlicher Hornstatus P*S. In: *Rinderzucht Fleckvieh*. 2: 29.

- Roman A.V. (2004)** L'élevage bovin en Égypte antique. Bull.soc.fr.hist.méd.sci.vét.; 3: 35-45.
- Rothammer S., Capitan A., Mullaart E., Seichter D., Russ I., Medugorac I. (2014)** The 80-kb DNA duplication on BTA1 is the only remaining candidate mutation for the polled phenotype of Friesian origin. Genet Sel Evol; 46: 44.
- Samraus H.H. (2011)** Farbatlas Nutztierassen. 7. Aufl. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Schafberg R., Swalve H.H. (2015)** The history of breeding for polled cattle. Livestock Science; 179: 54-70.
- Seichter D., Russ I., Rothammer S., Eder J., Förster M., Medugorac I. (2012)** SNP-based association mapping of the polled gene in divergent cattle breeds. Anim Genet; 43: 595-8.
- Simpson P. (1983)** Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in Drosophila Embryos. Genetics; 105: 615-32.
- Slatkin M. (2008)** Linkage disequilibrium – understanding the evolutionary past and mapping the medical future. Nat Rev Genet; 9: 477-85.
- Spillman W.J. (1905)** Mendel's Law in Relation to Animal Breeding. Journal of Heredity; os-1: 171-7.
- Spire M.F., Schalles R.R., Schoneweis D.A. (1981)** Radiographic differentiation of polled and dehorned cattle. J Am Vet Med Assoc; 179: 71-3.
- Swalve H.H. (2013)** Globale Tendenzen in der Rinder- und Schweinezucht. In: Tiere züchten – High Tech und Verantwortung Tierzuchtsymposium 2013: 17-31. 1. Aufl. Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan
- Sykes N., Symmons R. (2007)** Sexing cattle horn-cores: problems and progress. International Journal of Osteoarchaeology; 17: 514-23.
- Teare M.D., Barrett J.H. (2005)** Genetic linkage studies. The Lancet; 366: 1036-44.
- Teare M.D., Santibañez Koref M.F. (2014)** Linkage analysis and the study of Mendelian disease in the era of whole exome and genome sequencing. Briefings in Functional Genomics; 13: 378-83.
- Terwilliger J.D., Zöllner S., Laan M., Pääbo S. (1998)** Mapping genes through the use of linkage disequilibrium generated by genetic drift: 'drift mapping' in small populations with no demographic expansion. Human Heredity; 48: 138-54.

- Terwilliger J.D., Goring H.H. (2009)** Gene mapping in the 20th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. 2000. *Hum Biol*; 81: 663-728.
- Tetens J., Wiedemar N., Menoud A., Thaller G., Drögemüller C. (2015)** Association mapping of the scurs locus in polled Simmental cattle—evidence for genetic heterogeneity. *Anim Genet*; 46
- Tiergesundheitsdienst Bayern (2013)** Veröden der Hornanlage. http://www.tgd-bayern.de/webyep-system/programm/download.php?FILENAME=8-12-14-at-Dokument.pdf&ORG_FILENAME=Rind__Flyer_Ver%C3%B6den_der_Hornanlage.pdf Abgerufen am 28. April 2016.
- Tukel T., Sobic D., Al-Gazali L.I., Erazo M., Casasnovas J., Franco H.L., Richardson J.A., Olson E.N., Cadilla C.L., Desnick R.J. (2010)** Homozygous nonsense mutations in TWIST2 cause Setleis syndrome. *Am J Hum Genet*; 87: 289-96.
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. (2002)** A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*; 34: 1-31.
- Weiß C. (2008)** Basiswissen Medizinische Statistik. 4. Aufl. Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- White W.T., Ibsen H. (1936)** Horn inheritance in Galloway-Holstein cattle crosses. *Journal of Genetics*; 32: 33-49.
- Wiedemar N., Tetens J., Jagannathan V., Menoud A., Neuenschwander S., Bruggmann R., Thaller G., Drogemuller C. (2014)** Independent polled mutations leading to complex gene expression differences in cattle. *PLoS One*; 9: e93435.
- Wiedemar N., Drögemüller C. (2015)** A 1.8-kb insertion in the 3'-UTR of RXFP2 is associated with polledness in sheep. *Anim Genet*; 46: 457-61.
- Wiener D.J., Wiedemar N., Welle M.M., Drögemüller C. (2015)** Novel Features of the Prenatal Horn Bud Development in Cattle (*Bos taurus*). *PLoS One*; 10: e0127691.
- Williams H.D., Williams T. (1952)** The inheritance of horns and their modifications in polled Hereford cattle. *Journal of Heredity*; 43: 267-72.
- Windig J.J., Cozzi G., Vessier I. (2015)** Introduction to the special issue on alternatives for cattle dehorning. *Livestock Science*; 179: 1-3.

- Wunderlich K.R., Abbey C.A., Clayton D.R., Song Y., Schein J.E., Georges M., Coppieters W., Adelson D.L., Taylor J.F., Davis S.L., Gill C.A. (2006)** A 2.5-Mb contig constructed from Angus, Longhorn and horned Hereford DNA spanning the polled interval on bovine chromosome 1. *Anim Genet*; 37: 592-4.
- 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: 76-82.
- Yang J., Zaitlen N.A., Goddard M.E., Visscher P.M., Price A.L. (2014)** Advantages and pitfalls in the application of mixed-model association methods. *Nat Genet*; 46: 100-6.

9 ANHANG

Anhang 1: Fragebogen zur Erhebung des Hornstatus bei Fleckvieh-Tieren (nach Dr. Aurélien Capitan)

Hornstatuserhebung

Allgemeine Angaben zum Tier

Name des Tieres	Ohrmarke des Tieres	Rasse	Geburtsdatum des Tieres
Name des Vaters	Ohrmarke des Vaters	Name der Mutter	Ohrmarke der Mutter
Name des Züchters		Besitzer	
Aktueller Standort		Genotyp	Probe

Angaben zum Phänotyp des Tieres

Name des Untersuchers	Datum der Untersuchung	Alter des Tieres
-----------------------	------------------------	------------------

Hatte die untersuchende Person die Möglichkeit die Hornansatzstellen (bei hornlosen Tieren) abzutasten? Ja Nein

<u>Hornstatus rechts:</u> <input type="checkbox"/> Glatt hornlos <input type="checkbox"/> Vertiefung ¹ mit ca. cm <input type="checkbox"/> Stirnbeule ² mit ca. cm <input type="checkbox"/> Kruste <input type="checkbox"/> Wackelhorn ⁴ mit ca. cm <input type="checkbox"/> gehört mit ca.cm langen Hörnern <input type="checkbox"/> enthornt	<u>Hornstatus links:</u> <input type="checkbox"/> Glatt hornlos <input type="checkbox"/> Vertiefung mit ca. cm <input type="checkbox"/> Stirnbeule mit ca. cm <input type="checkbox"/> Kruste <input type="checkbox"/> Wackelhorn mit ca. cm <input type="checkbox"/> gehört mit ca.cm langen Hörnern <input type="checkbox"/> enthornt	<u>Form des Kopfes- Zwischenhornlinie (Frontalansicht):</u> <input type="checkbox"/> flach " — " <input type="checkbox"/> rund " ⌢ " <input type="checkbox"/> spitz " ⌣ " <input type="checkbox"/> sehr spitz " ⌵ "
<u>Form der Stirnnaht:</u> <input type="checkbox"/> aufgewölbt, mit Knochen-zubildung "  " <input type="checkbox"/> eben "  "	<u>Bei Wackelhörnern: Verbindung zum Schädel</u> Rechts: <input type="checkbox"/> fest <input type="checkbox"/> wenig verschieblich <input type="checkbox"/> stark verschieblich Links: <input type="checkbox"/> fest <input type="checkbox"/> wenig verschieblich <input type="checkbox"/> stark verschieblich	<u>Augen und Wimpern</u> <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> übermäßig lange Wimpern <input type="checkbox"/> mehrreihige, buschige Wimpern <input type="checkbox"/> Distichiasis <input type="checkbox"/> Entropium links <input type="checkbox"/> Entropium rechts

Sonstige Bemerkungen:

1. Falten- oder kreisförmige Einziehung der Haut 2. Knöcherne, nicht bewegliche, häufig halbkugelförmige Beule an der Hornansatzstelle 3. Bewegliche, verschieden große Hornschuppe an der Hornansatzstelle 4. Bewegliches, nur mit der Haut verbundenes Horn, das im Alter auch fest anwachsen kann

10 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich der Tierzuchtforschung e.V. München und Herrn Dr. Ingolf Ruß sowie dem Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch und Herrn Dr. Johannes Aumann, die meine Stelle geschaffen und dieses Projekt finanziert und unterstützt haben, meinen besonders großen Dank aussprechen.

Meinem Doktorvater Herrn PD Ivica Međugorac möchte ich ganz herzlich für das in mich gesetzte Vertrauen, die umfassende Betreuung, die vielen guten Ratschläge und seine immerwährende Unterstützung danken. *Vielen, vielen Dank für zweieinhalb schöne, lehrreiche und unvergessliche Jahre!*

Ein riesengroßes Dankeschön geht weiterhin an Dr. Sophie Rothhammer und Dr. Elisabeth Kunz für die Mitbetreuung dieser Arbeit. *Liebe Sophie, liebe Elisabeth, was wäre meine Doktorandenzeit ohne euch gewesen? All die wunderschönen und lustigen Momente in und außerhalb unseres gemeinsamen Büros werden diesen Lebensabschnitt für immer für mich leuchten lassen! DANKE!*

Zum Gelingen dieser Arbeit haben eine Reihe weiterer Personen und Institutionen maßgeblich beigetragen. Für die Hilfe bei der Zusammenstellung des Proben- und Datenmaterials sowie dessen Auswertung danke ich:

- Den Besamungsstationen Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch e.V., Bayern Genetik GmbH, Zweckverband II für künstliche Besamung der Hausrinder Greifenberg, CRV Deutschland GmbH in Wasserburg am Inn und dem Besamungsverein Nordschwaben e.V. in Höchstädt für die Möglichkeit zur Phänotypisierung ihrer hornlosen Fleckviehbullen und die Bereitstellung von Sperma zur Genotypisierung
- Der bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft für die Möglichkeit weitere Phänotypen und Proben zu sammeln
- Dem Rinderzuchtverband Franken e.V. für die Gelegenheit, Kälbermärkte zur Beobachtung von Phänotypen juveniler Tiere nutzen zu können

- Der Schlachthofbetriebs GmbH Fürth und insbesondere Herrn Timo Baumann für die Sammlung von Fleckviehhörnern für die Pneumatisationsstudie
- Der Klinik für Wiederkäuer der LMU München für die Nutzung der Röntgenanlage
- Der Arbeitsgemeinschaft Süddeutscher Rinderzüchter (ASR) und dem Landeskuratorium der Erzeugerringe für tierische Veredelung in Bayern e.V. (LKV Bayern) für die Überlassung der *SNP*-Genotypen
- Herrn Prof. Dr. Cord Drögemüller für die Bereitstellung von Phäno- und *SNP*-Genotypen
- Herrn Dr. Aurélien Capitan für den Fragebogen zur Phänotypisierung
- Frau Dr. Doris Seichter für die Durchführung von Hornlostests und Genotypisierungen
- Frau Andrea Hefner für die Hilfe bei der Phänotypisierung und Beprobung und für die Weitergabe ihrer umfangreichen Kenntnisse zur Hornloszucht im Fleckvieh
- Herrn Johann Robeis für eine besonders gute Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Informationen und Beobachtungen zu Wackelhörnern und dem verzögerten Hornwachstum, sowie für die stets guten fachlichen Diskussionen
- Allen Fleckviehzüchtern für ihre Zeit und ihre hervorragende Mitarbeit

Ein lieber Dank geht außerdem an meine Mitdoktoranden Dr. Marc-Philipp Müller, Fanny Bitzer, Victoria Göckmann, Charlotte Friederike Hoffmann, Regina Thum, Lena Breitenfellner und Kim Eck für eine sehr schöne gemeinsame Zeit.

Ebenfalls danken für ihre freundliche und immer hilfsbereite Art möchte ich den weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Populationsgenomik: Martin Dinkel, Renate Damian, Karina Schadt, Foteini Kyriakou und den beiden Gastwissenschaftlerinnen Jelena Ramljak und Mojca Simčič.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden, die mich zum Teil schon seit dem Kindergarten begleiten. Aber natürlich auch bei allen, die in der Schule oder im Studium dazu gekommen sind. *Danke, dass ich immer auf euch zählen kann!*

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Stephan Krasser. *Lieber Stephan, Dich habe ich während dieser Arbeit kennengelernt und kann dieses Glück immer noch nicht ganz fassen. Tausend Dank für Deinen grenzenlosen Optimismus und Deine unglaublich liebe Art, mit der Du mein Leben jeden Tag bereicherst.*

Und zum guten Schluss geht der größte Dank an meine lieben Eltern und meine großartigen Geschwister.

Lieber Papa, liebe Mama, lieber Marc und liebe Steffi, ihr seid absolut immer, zu jeder Uhrzeit und in jeder Lebenslage für mich da. Der Dank, den ich euch dafür aussprechen möchte, lässt sich eigentlich nicht in Worte fassen. Ihr seid die allerbesten!