Universität für Bodenkultur Wien

Department für nachhaltige Agrarsysteme

Institut für Nutztierwissenschaften



Masterarbeit

Entropium Suche eines möglichen genetischen Hintergrundes

Martin Peter Stückler 0840774

Supervisor:

Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Johann Sölkner

Department für nachhaltige Agrarsysteme

Institut für Nutztierwissenschaften

Co-Supervisor:

Dr. Gábor Mészáros

Department für nachhaltige Agrarsysteme

Institut für Nutztierwissenschaften

ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	2
MATERIAL UND METHODEN	4
PHÄNOTYPEN UND GENOTYPEN	4
QUALITÄTSKONTROLLE	
Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)	4
Run of Homozygosity (homozygosity mapping)	
GENOMWEITE ASSOZIATIONSSTUDIEN	
Run of Homozygosity	7
ERGEBNISSE	8
SINGLE SNP ANALYSE	8
Manhattan-Grafik (ohne Populationsstruktur; ohne unsichere Fälle)	8
QQ-Grafik (ohne Populationsstruktur; ohne unsichere Fälle)	9
Manhattan-Grafik (ohne Populationsstruktur; mit unsicheren Fällen)	10
QQ-Grafik (ohne Populationsstruktur; mit unsicheren Fällen)	
Manhattan Grafik (mit Populationsstruktur; ohne unsichere Fälle)	
QQ-Grafik (mit Populationsstruktur; ohne unsichere Fällen)	
DETAILLIERTE BESCHREIBUNG	
ITGA9	
Manhattan-Grafik (mit Populationsstruktur, mit unsicheren Fällen)	
QQ-Grafik (mit Populationsstruktur; mit unsicheren Fällen)	
DETAILLIERTE BESCHREIBUNG	
KCNIP4	
ROH	
Chromosom 2	
Chromosom 6	
Chromosom 11	
Chromosom 13	
Chromosom19	
Chromosom 21	
DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG	
LITERATURVERZEICHNIS	
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	
ABELLENVERZEICHNIS	46
OTOVERZEICHNIS	47

Zusammenfassung

Die Krankheit Entropium, auch Rolllid genannt, tritt beim Rind hauptsächlich bei Stieren auf und bezieht sich auf das obere bzw. untere Augenlid, das durch das Eindrehen eine Reizung verursacht, die nur operativ behoben werden kann.

Das Ziel dieser Studie war es einen möglichen genetischen Hintergrund der Krankheit Entropium in der Fleckviehpopulation zu finden. Es sollte nach Bereichen am Genom gesucht werden, welche für die Ausprägung der Krankheit verantwortlich sind.

Zur Verfügung standen insgesamt 196 Fleckviehtiere. Von diesen 196 waren 177 Kontrolltiere, 9 erkrankte Tiere und 10 Stiere mit einer Veränderung der Augenlider in Richtung Rolllid ohne eine weitere klinische Veränderung. Die Diagnose wurde von Tierärzten oder der Veterinärmedizinischen Universität gestellt. Die Tiere waren alle genotypisch untersucht. SNP-Chip Genotypen wurden zur Analyse der Assoziation von Regionen des Genoms mit der Ausprägung von Entropium verwendet.

Zwei verschiedene Analyse-Typen wurden angewandt zum einen eine klassische Assoziationsanalyse und zum anderen die Suche nach Unterschieden von erkrankten und Kontrolltieren im Inzuchtgrad von Regionen des Genoms über homozygote Segmente (Runs of Homozygosity).

Bei der Single SNP Analyse wurden zwei signifikante Gene gefunden: KCNIP4 und ITGA9. Das Gen KCNIP4 ist am Chromosom 6 positioniert. Es wurde keine Literatur zu diesem Gen gefunden, die auf einen Zusammenhang mit der Augenerkrankung hinweist. Das Gen ITGA9 liegt am Chromosom 22. Hierzu wurden wissenschaftliche Arbeiten gefunden, welche auf einen genetischen Hintergrund hindeuten.

Bei der Run of Homozygosity Analyse wurden 75 SNPs signifikante SNPs gefunden, welche zu 19 Genen führten. Die Literatursuche ergab keinen Hinweis darauf, dass eines dieser Gene ein funktioneller Kandidat für Entropium sein könnte.

Einleitung

Unter Entropium, auch Rolllid genannt, wird eine Augenkrankheit verstanden, die bei vielen Säugetieren auftritt. Diese Krankheit kann sich auf das untere, sowie auf das obere Augenlid beziehen. Das Problem entsteht durch das Drehen des Augenlides nach innen. Mit dem Eindrehen werden auch Wimpern und Augenlidhaare in Richtung des Auges gewendet. Diese Haare verursachen eine Reizung der Hornhaut (Luiz et al. 1999).



Foto 2: Rolllid



Foto 1: Veränderung des Augapfels



Foto 4: Verlust des Augapfels



Foto 3: Veränderung des Augapfels

Quelle: Veterinärmedizinische Universität Wien

Die Folgen des Entropiums sind Entzündungen der Horn- und Netzhaut. Es kann unter Umständen zu chronischen Schäden an den Augen kommen, bis hin zum Verlust der Sehkraft führen.

Derzeit ist eine Behandlung nur durch einen chirurgischen Eingriff möglich.



Foto 5: Stier vor operativer Behandlung



Foto 6: Stier nach operativer Behandlung

Quelle: GENOSTAR Rinderbesamung GMBH

Die Häufigkeit von Entropium in der Fleckvieh-Population ist durch fehlende Aufzeichnungen weitgehend unbekannt.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht genetische Ursachen für das Auftreten des Rolllids zu identifizieren. Dazu wurden zum einen eine klassische Case-Control-Assoziationsanalyse durchgeführt und zum anderen erfolgte die Suche nach einer rezessiven Vererbung der Erkrankung mittels der "Homozygosity-Mapping" Methode.

Material und Methoden

Phänotypen und Genotypen

Es wurde mit 196 Fleckviehstieren gearbeitet, die genotypisch untersucht wurden. Von diesen 196 Tieren wurde bei 9 Probanden die Krankheit Entropium diagnostiziert. Bei 10 Stieren wurde eine Veränderung des unteren Augenlides in Richtung eines Rolllides festgestellt, ohne weitere klinische Erscheinungen. Letztere werden im weiteren Verlauf der Arbeit als "unsichere Fälle" bezeichnet. 177 dieser 196 genotypisierten Rinder wurden zur Kontrolle bereitgestellt, die keine Veränderung im Bereich der Augen aufwiesen. Die verwendeten Phänotypen und Genotypen wurden von der Zentralen Arbeitsgemeinschaft österreichischer Rinderzüchter (ZAR) zur Verfügung gestellt.

Die Diagnose der Rinder wurde von Tierärzten oder von der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt.

Die Genotypisierung erfolgte über einen Illumina bovine 54k-SNP-Chip.

Qualitätskontrolle

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Die Überprüfung der Genotypen wurde in Plink (2009) vorgenommen.

Die "minor allele frequency" (MAF) wurde mit 1% festgesetzt (MAF ≤ 1%).

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde ebenfalls zur Kontrolle herangezogen, um mögliche Fehler bei der Genotypisierung zu erkennen. Der Test wurde mit einem Signifikanzniveau von 10⁻⁶ durchgeführt.

Weiters wurden jene Tiere aus der Untersuchung ausgeschlossen, bei denen die Genotypisierung unter 90% lag (-- mind 0.9). Mit der Funktion "-- geno 0.9" wurden alle SNPs unberücksichtigt gelassen, für welche weniger als 90 % der Allele erfolgreich genotypisiert wurden.

Für die genomweiten Assoziationsstudien wurden die Tiere in weitere Gruppen unterteilt, die auch separat voneinander die Qualitätskontrolle durchliefen.

Die unsicheren Fälle wurden zu den kranken Tieren gezählt und den Kontrolltieren gegenüber gestellt. Daraus resultierte eine Anzahl von 19 kranken Stieren und 142 gesunden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde diese Gruppe "unsure-are-sick" genannt. Am Anfang waren 41977 SNPs vorhanden. Nach Durchführung der Qualitätskontrolle befanden sich in der Gruppe unsure-are-sick 36624 SNPs.

In der zweiten Gruppe wurden die unsicheren Fälle von den Untersuchungen ausgeschlossen. Somit standen den 142 gesunden Fleckviehstieren 9 kranke gegenüber. In dieser Kategorie resultierten 36682 Einzelnukleotid-Polymorphismen für die Analyse.

Die weiteren Assoziationsstudien liefen für beide Gruppen parallel.

Run of Homozygosity (homozygosity mapping)

Die Qualitätskontrolle für die Analyse Run of Homozygosity wurde nicht mit denselben Kriterien durchgeführt wie für die genomweiten Assoziationsstudien. Es wurden ebenfalls nur SNPs herangezogen, bei denen die Genotypisierung zu 90% vollständig war. Der GenCall score musste ≥ 0.7 sein oder der GenTrain score ≥ 0.4.

In dieser Qualitätskontrolle wurde die minor allele frequency nicht berücksichtigt. Das Hardy-Weinberg-Gesetz wurde für diesen Schritt ebenfalls nicht miteinbezogen. Die Kriterien wurden aus dem wissenschaftlichen Artikel "Estimates of autozygosity derived from selected cattle populations" entnommen (Ferenčaković et al. 2013).

Genomweite Assoziationsstudien

Single SNP analysis

Zur Identifizierung, ob einzelne Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) mit der Krankheit assoziiert werden können, wurde die Single SNP Analyse herangezogen. Dieses Verfahren wurde im statistischen Programm R durchgeführt. Die verwendete Zusatzsoftware war die Gemtool R (Klei et al. 2011).

Die Single SNP Analyse ist ein lineares Modell, bei dem der Phänotyp wie auch der Genotyp eingeschlossen werden. Diese Assoziationsstudie berechnet den Effekt jedes SNPs. Um diese Ergebnisse darzustellen, wurde der p-Wert (das Signifikanzniveau) in den negativen log (-log) transformiert.

Dieses lineare Modell wurde in mehreren Varianten durchgeführt. Es wurden, wie bereits beschrieben, die beiden Gruppen kranker Tiere unterschieden und es erfolgten Analysen mit und ohne Berücksichtigung der Populationsstruktur.

Die resultierenden vier Berechnungen wurden getrennt voneinander durchgeführt und grafisch im statistischen Programm R dargestellt. Die Eigenvektoren für die Populationsstrukturen wurden ebenfalls über Gemtool R ermittelt (KLEI et al., 2010).

Es wurden Manhattan-Farb-Grafiken verwendet. Mit dieser Methode wurden die einzelnen Chromosomen farblich unterschiedlich markiert, um visuell schnell erkennbar zu machen, auf welchen Chromosomen auffällige Effekte zu finden sind.

Zur Feststellung welche Bereiche bzw. welche SNPs von Interesse sein könnten und mit der Krankheit Entropium assoziiert werden können, wurde die Bonferroni Schwelle mit einem Signifikanzniveau von 0.05 berechnet und ebenfalls zur Veranschaulichung in den Grafiken dargestellt.

Jene Bereiche, die den log(-log) von 4 überschritten, wurden extrahiert um deren genaue Position festzustellen. P-Werte, welche die Bonferroni Schwelle (-log >5) überschritten, wurden ebenfalls extrahiert und mit dieser Information wurde nach den hier angesiedelten Genen in der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Website gesucht. Zu den entsprechenden Genen wurde nach vorhandener Literatur gesucht, die Rückschlüsse auf einen Zusammenhang im Bereich der Augen geben sollte.

Weiters wurden Q-Q-Grafiken verwendet. Diese Quantil-Quantil-Darstellungen sind sehr hilfreich für univariate Analysen. Sie dienen der Beurteilung auf Zuverlässigkeit, aufgrund von Ausreißern und der Verteilung einer Probe (Marden 2004).

Run of Homozygosity

Die Run of Homozygosity Analyse zeigt Bereiche des Genoms auf, die auf eine kontinuierliche Strecke homozygot sind. Diese Bereiche werden "runs of homozygosity" genannt (ROH). Lange Bereiche der ROH entstehen meist durch Inzucht. Diese homozygoten Strecken sind aber auch hilfreich zur Analyse der Populationsgeschichte, der Inzuchtebenen, des Einflusses der Inzucht auf komplexe Merkmale und angeborene Störungen (Ferenčaković et al. 2013).

ROH wurden unter verschiedenen Kriterien dargestellt, um eine bestmögliche Visualisierung zu erhalten.

Kriterien:

- fehlende Genotypen nicht erlaubt
- die Länge der ROH
- die darin minimal enthaltenen SNPs
- die Dichte der SNPs bezogen auf eine Länge

Die Run of Homozygosity Analyse wurde 6-mal mit verschiedenen Optionen durchgeführt, wobei das Fehlen von Genotypen nie erlaubt war und ROH immer eine minimale Länge von 1000kb aufweisen musste. Die minimale Anzahl an SNPs wurde auf 10, 15 und 30 SNPs festgesetzt.

Aus den erhaltenen Daten wurden Grafiken erstellt, die das Verhältnis der ROHs zwischen Kontrolltieren und erkrankten Tieren aufzeigen. Um die Relevanz der Unterschiede zu erkennen, wurden p-Werte berechnet. Diese Werte wurden in einem negativen Logarithmus ausgedrückt (-neglog¹⁰). Bei einem –neglog¹⁰ von 4 wurden die Bereiche näher betrachtet. Auf der Internetseite National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurde nach Genen gesucht, auf denen die Basenpaare liegen und einen Indiz für den genetischen Zusammenhang des Gens und der Augen geben.

Ergebnisse

Single SNP Analyse

Die Single SNP Analyse wurde zuerst ohne die unsicheren Fälle durchgeführt. Es waren nur 9 erkrankte Tiere und die 142 Kontrolltiere inkludiert. Die Populationsstrukturen wurden ebenfalls unberücksichtigt gelassen. Der p-Wert ist an der y-Achse gekennzeichnet und die Chromosomen an der x-Achse. Die Bonferroni Schwelle ist in einem –log¹⁰ p-Wert ausgedrückt und beträgt 5,8 (Abbildung 1).

Manhattan-Grafik (ohne Populationsstruktur; ohne unsichere Fälle)

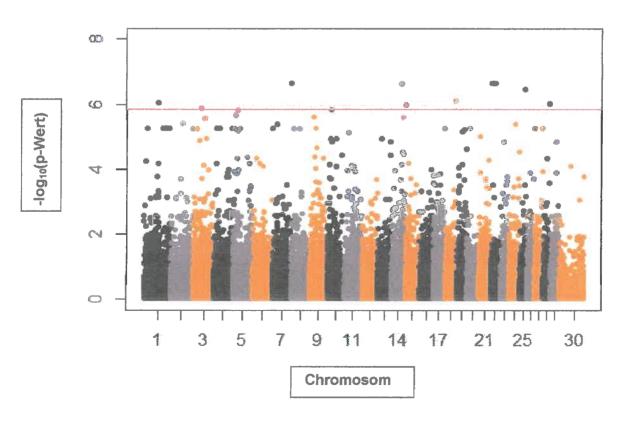


Abbildung 1: Manhattan-Farb-Grafik ohne Berücksichtigung der Populationsstruktur und unter Ausschluss der unsicheren Fälle

Viele SNPs sind nahe der Bonferroni Schwelle und einige überschreiten die Schwelle. Fast jedes Chromosom enthält SNPs, die sich der Schwelle nähern bzw. überschreiten. Diesogenannten "peaks", welche auf der Abbildung 1 sehr hoch positioniert liegen, sind das Resultat der fehlenden Einbeziehung der Populationsstruktur. Es sind 9 Marker über der Bonferroni Schwelle und 3 streifen den Wert von 5.8.

Die SNPs die über der Bonferroni Schwelle liegen, sind an den Chromosomen 1,7, 14, 18, 22, 25 und 28.

Jene die dem Bonferroni Grenzwert nahe kommen, sind an den Chromosomen 3, 5 und 10.

Bei der Quantil-Quantil Darstellung (Abbildung 2) wird auf der y-Achse der ermittelte p-Wert dargestellt und auf der x-Achse der erwartete p-Wert. Beide Wahrscheinlichkeitswerte werden in einem negativen Logarithmus ausgedrückt.

QQ-Grafik (ohne Populationsstruktur; ohne unsichere Fälle)

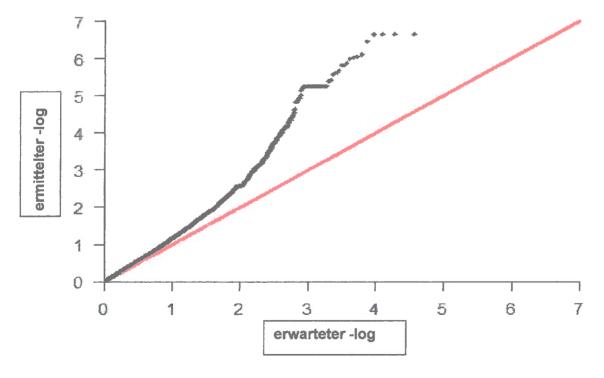


Abbildung 2: Q-Q-Grafik ohne Berücksichtigung der Populationsstruktur und unter Ausschluss der unsicheren Fälle

Diese Q-Q Grafik zeigt große Abweichungen zwischen den erwarteten und den ermittelten p-Werten. Ausreißer sind keine zu erkennen. Ein Grund für den erheblichen Unterschied der Wahrscheinlichkeitswerte könnte sein, dass die Populationsstrukturen nicht miteinbezogen wurden.

Manhattan-Grafik (ohne Populationsstruktur; mit unsicheren Fällen)

In dieser Situation werden die unsicheren Fälle zu den kranken Tieren gezählt. Populationsstrukturen sind hier nicht miteinbezogen. Es sind somit 19 erkrankte Tiere und 142 Kontrolltiere an der Analyse beteiligt. Die Bonferroni Schwelle ist unverändert auf 5,8.

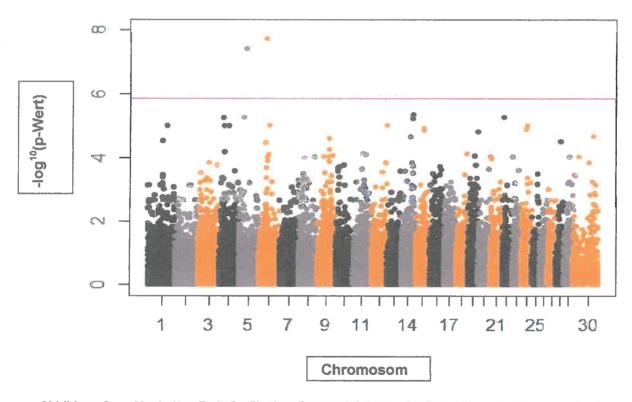


Abbildung 3: Manhattan-Farb-Grafik ohne Berücksichtigung der Populationsstrukturen und unter Einbeziehung der unsicheren Fälle

Die Ergebnisse zeigen deutlich niedrigere Signifikanzniveaus als unter Ausschluss der unsicheren Fälle (Abbildung 3). Bei Chromosom 5 und 6 sind die p-Werte über der Bonferroni Schwelle zu erkennen.

QQ-Grafik (ohne Populationsstruktur; mit unsicheren Fällen)

Diese Q-Q Darstellung (Abbildung 4) ist mit den unsicheren Fällen und ohne die Populationsstruktur der dazugehörigen Mahatten Grafik (Abbildung 3).

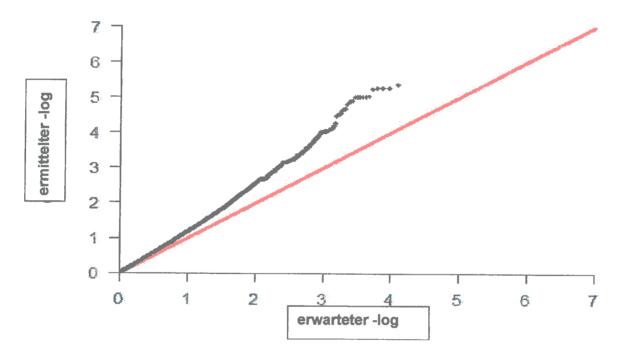


Abbildung 4: Q-Q-Grafik ohne Berücksichtigung der Populationsstrukturen und unter Einbeziehung der unsicheren Fälle

In der Kurve sind keine deutlichen Ausreißer zu erkennen. Die hier ersichtlichen p-Werte sind deutlich abgeflachter als in der vorhergehenden Q-Q Grafik. Trotz nicht berücksichtigter Populationsstrukturen sind sich die erwarteten und ermittelten Wahrscheinlichkeitswerte sehr nahe.

(Marchini et al. 2004) stellt in einem Artikel fest, dass die fehlende Berücksichtigung von Populationsstrukturen in großen Assoziationsstudien zu erheblichen Verfälschungen führen kann.

Manhattan Grafik (mit Populationsstruktur; ohne unsichere Fälle)

Im Folgenden wurden beide Analysen ein weiteres Mal durchgeführt. Nun wurden die Populationsstrukturen miteinberechnet. Zuerst wurde nur mit den eindeutig als krank identifizierten Stieren gearbeitet.

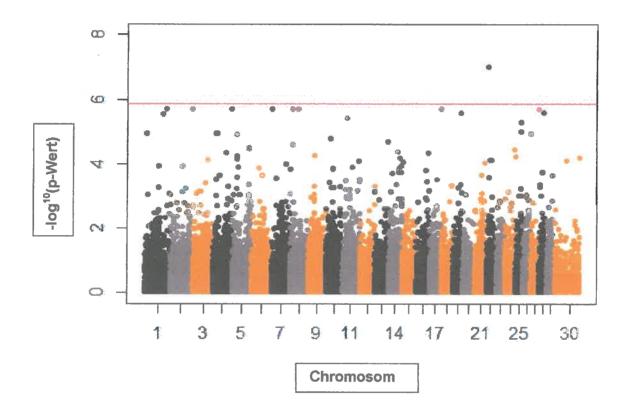


Abbildung 5: Mannhatten-Farb-Grafik unter Berücksichtigung der Populationsstruktur und unter Ausschluss der unsicheren Fälle

QQ-Grafik (mit Populationsstruktur; ohne unsichere Fälle)

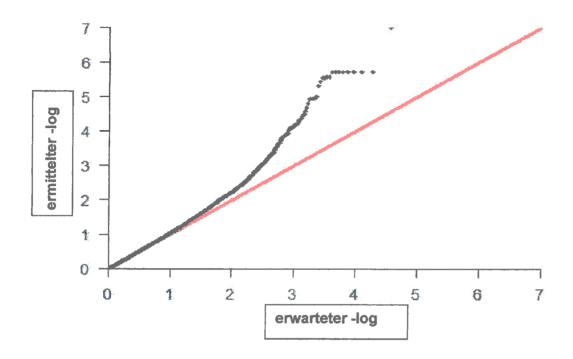


Abbildung 6: Q-Q-Grafik unter Berücksichtigung der Populationsstruktur und unter Ausschluss der unsicheren Fälle

Es ist deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 5), dass die Signifikanzen der SNPs bei der Manhattan Grafik tiefer liegen als ohne Berücksichtigung der Populationsstruktur. Viele SNPs sind nahe der Bonferroni Schwelle von 5,8. Am Chromosom 22 kann man einen SNP deutlich erkennen, der über die Bonferroni Schwelle liegt.

Erwartete und ermittelte Wahrscheinlichkeiten sind durch die Populationsstruktur ebenfalls näher aneinander gekommen. Die Kurve weist einen wesentlich abgeflachteren Verlauf auf (Abbildung 6).

Detaillierte Beschreibung

"SNP"	"SNP-Name"	"CHR"	"BP"	"p-Wert"
"1640"	"BTB-00049530"	1	112069759	5.55073420834214
"1641"	"ARS-BFGL-NGS-12115"	1	112128505	5.55073420834214
"1921"	"ARS-BFGL-NGS-60325"	1	130874607	5.71296711395513
"4256"	"BTA-26833-no-rs"	2	135433480	5 71296711395513
"7767"	"ARS-BFGL-NGS-38960"	4	118127054	5.71296711395513
"11144"	"ARS-BFGL-NGS-28272"	7	2008771	5.71296711395513
"12841"	"BTB-00095463"	8	15366998	5.71296711395513
"13346"	"BTA-29390-no-rs"	8	48986578	5.71296711395513
"26028"	"ARS-BFGL-NGS-104070"	17	70728195	5.71296711395513
"27715"	"BTB-00758145"	19	49826620	5 57891603062312
"30216"	"ARS-BFGL-NGS-40402"	22	11094412	6.9980222819095
"34636"	"ARS-BFGL-NGS-2841"	27	44952306	5.71296711395513
"34963"	"Hapmap51751-BTA-63790"	28	23500352	5.57653951512658

Tabelle 1: Detaillierte Beschreibung der SNPs

Jene Marker, die einen p-Wert von über 5,5 aufweisen wurden detaillierter beschrieben (Tabelle 1). Die erste Spalte ist die SNP-Nummer, gefolgt vom SNP-Namen. Danach ist das Chromosom angeführt, auf dem der SNP liegt. BP ist die genaue Basenpaarposition und am Ende ist der p-Wert des SNPs angegeben.

Durch die genauere Betrachtung in Plink (2009) ist zu sehen, dass es sich um die SNP-Nummer 30216 handelt. Der, auch nach Bonferroni-Korrektur, signifikante SNP hat einen p-Wert von 6.998022281909. Auf Chromosom 22 ist die SNP-Position ist 11,094,412.

Diese Position liegt am Gen ITGA9. ITGA9 ist ein proteincodierendes Gen und wird integrin, alpha 9 genannt. Dieses Gen ist am Chromosom 22 und die Basenpaarposition reicht von 10,946,191 bis 11,307,08 (NCBI 2013).

ITGA9



Abbildung 7: Gen ITGA 9

(NCBI 2013)

Abbildung 7 zeigt einen Ausschnitt des Gens integrin, alpha 9 am Genom. Die rot markierte Linie zeigt den SNP 30216.

Das Gen ITGA 9 hat eine Aufgabe in der Entwicklung der Augenlider bei neugeborenen Mäusen. Es ist unter anderem verantwortlich für die Ausbildung der epidermalen Zellmembranen am Auge. Integrine spielen prinzipiell eine große Rolle bei der Entwicklung der Lider (Stepp 1999).

(Banks 1999) brachte das Protein integrin, alpha 9 in ihrer Studie mit Fehlbildungen der Augenlider in Verbindung. Sie verwies außerdem auf den Zusammenhang des Gens mit der Entwicklung des Augenlides.

In einem weiteren Artikel schreibt (Stepp et al. 1995) vom Einfluss des integrin alpha 9 auf die Entwicklung der Augenlider bei neugeborenen Mäusen.

Weiters wird in einem wissenschaftlichen Artikel (Truong et al. 2011) der Zusammenhang vom Gen ITGA9 und der Entzündung der Hornhaut indiziert. Es wird ebenfalls der Einfluss des Gens auf den Umgebungsbereich des Auges diskutiert und nicht ausgeschlossen.

Manhattan-Grafik (mit Populationsstruktur, mit unsicheren Fällen)

Im letzten Schritt der Single SNP Analyse wurden die unsicheren Fälle zu den kranken Tieren gezählt. Die Populationsstruktur wurde ebenfalls in die Studie miteinbezogen.

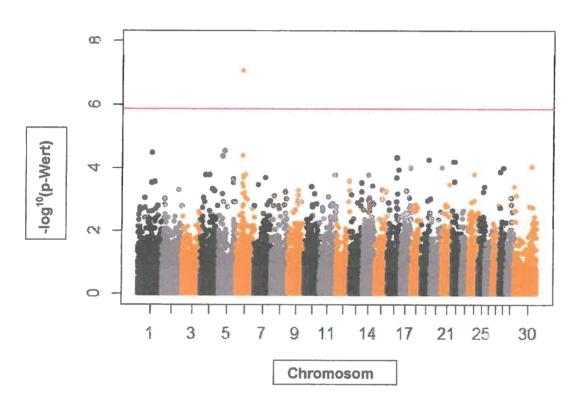


Abbildung 8: Manhattan-Farb-Grafik unter Berücksichtigung der populationsspezifischen Faktoren und im Einbeziehung der unsicheren Fälle

Die Manhattan Grafik (Abbildung 8) zeigt nun eine deutliche Veränderung. Alle Marker sind stark abgesunken. Auf Chromosom 6 ist ein SNP über der Bonferroni Schwelle.

QQ-Grafik (mit Populationsstruktur; mit unsicheren Fällen)

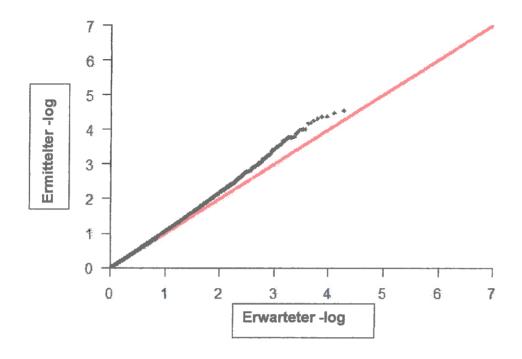


Abbildung 9: Q-Q-Grafik unter Berücksichtigung der populationsspezifischen Faktoren und mit Einbeziehzng der unsicheren Fälle

Die Q-Q-Darstellung (Abbildung 9) hat sich ebenfalls verändert. Die Kurve ist nun sehr nahe dem erwarteten P-Wert.

Detaillierte Beschreibung

SNP	Name	CHR	BPP	p-Wert
"9953"	"BTA-75919-no-rs"	6	41942484	7.06564075545099

Tabelle 2: Detaillierte Beschreibung der SNPs

Wiederum wurden alle SNPs hervorgehoben, die einen p-Wert von über 5,5 aufweisen. In diesem Fall war nur ein Marker über dieser Grenze. Die SNP Nummer 9953 reicht über die Bonferroni Schwelle mit einem Wahrscheinlichkeitswert von 7.06564075545099. Die genaue Basenpaarposition ist 41,942,484 und liegt am Chromosom 6.

Diese Basenpaarposition liegt am Gen KCNIP4. Die genaue Begrenzung des Gens reicht von 41,707,928 bis 43,021,696. Die volle Bezeichnung des Gens ist Kv channel interacting protein 4. Es ist ebenfalls ein proteincodierendes Gen (NCBI 2013).

Für dieses Gen wurden keine wissenschaftlichen Studien gefunden, die ein Indiz auf den Zusammenhang mit Augenlidern geben.

Das Gen KCNIP4 ist in einer GWAS von asthmakranken Mäusen und Menschen als Asthma Gen identifiziert worden. Es wird in mehreren Studien mit Asthma in Verbindung gebracht (Strunk et al. 2013).

In einem weiteren Artikel wird dem Gen KCNIP4 die Mitwirkung im Nervensystem zugesprochen (Limviphuvadh et al. 2010).

KCNIP4

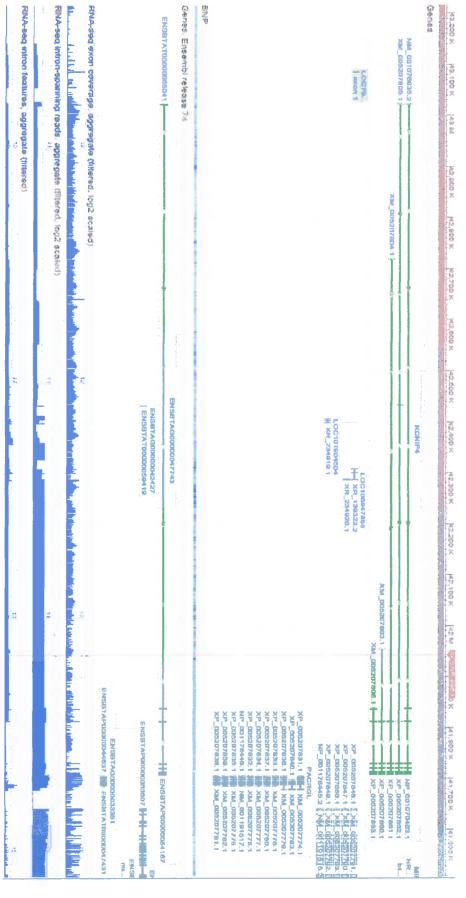


Abbildung 10: Gen KCNIP4

(NCBI 2013)

Abbildung 10 zeigt einen Ausschnitt des Gens KCNIP4 am Chromosom 6. Die rote Linie zeigt den SNP Nummer 9953.

Interpretation der Ergebnisse der GWAS-Analyse

Bei der ersten Single SNP Analyse wurde ohne Berücksichtigung der Populationsstruktur gearbeitet. Dieses Vorgehen hat die p-Werte nach oben verschoben bzw. es hat viele p-Werte, bei Ausschließung der unsicheren Fälle, über die Bonferroni Schwelle gebracht. Insgesamt waren 9 SNPs über dem p-Wert von 5,8. Auch die QQ-Grafik weist hier eine hohe Abweichung von erwarteten und gemessenen Werten auf.

Auch unter Einbeziehung der unsicheren Fälle waren keine klaren Ergebnisse ersichtlich, da auch hier die Populationsstruktur unberücksichtigt gelassen wurde. Die QQ-Grafik weist jedoch eine abgeflachtere Kurve auf.

Bei der weiteren Bearbeitung der Daten wurde die Populationsstruktur miteinberechnet. Es war deutlich, dass dadurch die p-Werte stark reduziert werden. Bei dem vorhergehenden Versuch waren noch 9 SNPs über der Bonferroni Schwelle. Bei der neu durchgeführten Analyse war nur mehr ein SNP über dem Grenzwert von 5,8. Es handelt sich um den SNP 30216 auf dem Chromosom 22 und weist einen p-Wert von 6,9980222819095 auf. Dieser SNP liegt am Gen ITGA9.

Dieses Gen wird in der Literatur häufig mit der Entwicklung der Augenlider in Verbindung gebracht. Es ist ebenfalls des Öfteren in diversen wissenschaftlichen Artikeln der Einfluss des Gens ITGA9 auf den Bereich der Augen angeführt.

Bei der letzten Durchführung der Single SNP Analyse wurde wieder ein SNP mit einem sehr hohen p-Wert (7,06564075545099) analysiert. Die SNP-Nummer 9953 liegt auf dem Gen KCNIP4. Dieses Gen ergab kein Indiz auf einen Zusammenhang mit den Augen bei bereits vorhandenen Studien.

ROH

Bei der Analyse Runs of homozygosity (ROH) wurden nur die Stiere mit sicherer Erkrankung miteinbezogen. Unsichere Fälle wurden ganz ausgeschlossen.

Die Grafiken zeigen immer ein Chromosom, wobei die untere Hälfte beschreibt, wie oft homozygote Strecken bei den gesunden Tieren im Verhältnis zu den kranken Tieren vorkommen. Die blaue Linie kennzeichnet die gesunden Tiere, die rote Linie die Tiere mit Entropium.

Der darüber liegende Teil der Grafik bildet die dazugehörigen Signifikanzen ab. An der x-Achse wird die Position am Chromosom angegeben.

Chromosom 2

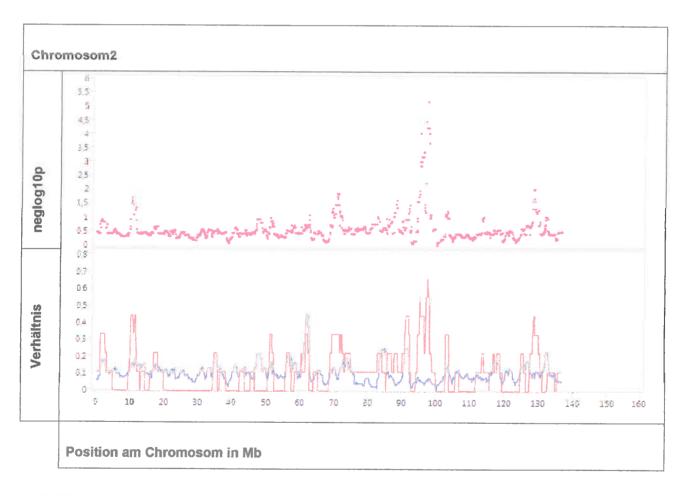


Abbildung 11: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 2

Auf dem Chromosom 2 wurden 27 SNPs festgestellt, die einen –neglog¹⁰ von über 3 erreichten (Abbildung 2, Tabelle 2).

Chromosom 2

Nr.	Position am CHR	-neglog ¹⁰	Gen
1	95299621	4,043993074	ADAM23
2	95463866	3,017806496	
3	95709778	3,017806496	
4	95752707	3,017806496	
5	95861435	3,187872406	
6	95884143	3,187872406	
7	96021111	3,187872406	
8	96049233	3,187872406	
9	96388684	3,187872406	
10	96410491	3,379595381	
11	96570370	3,379595381	PLEKHM3
12	96612179	3,379595381	PLEKHM3
13	97098833	4,458939178	PTH2R
14	97133448	4,458939178	PTH2R
15	97166703	4,458939178	PTH2R
16	97237319	4,240522968	
17	97457613	4,240522968	
18	97568903	5,179940802	
19	97794765	4,240522968	MAP2
20	97828486	4,240522968	MAP2
21	97861814	4,043993074	MAP2
22	97955332	4,043993074	MAP2
23	97999640	4,043993074	MAP2
24	98073699	3,702296698	UNC80
25	98112765	3,702296698	UNC80
26	98139821	3,702296698	UNC80
27	98160191	3,702296698	UNC80

Tabelle 3: p-Werte über 3 am CHR 2

Es sind alle p-Werte angeführt die am Chromosom 2 sind und einen —neglog¹⁰ von über 3 aufweisen. Gereiht sind sie nach deren Position am Chromosom und sie sind mit Nummern versehen.

In der rechten Spalte wird jenes Gen angeführt, das in der Datenbank (NCBI 2014) an der Chromosomenposition der Rinder positioniert ist. In den Zeilen in denen kein Gen eingetragen ist, ist kein eingetragenes Gen vorzufinden.

ADAM 23

"A disintegrin and metalloproteinase domain 23" (ADAM23) ist ein proteincodierendes Gen. Es gehört zu der ADAMs Familie und ist am Chromosom 2 von 95,144,865 bis 95,342,298 vorzufinden (NCBI 2014).

Insgesamt sind 33 ADAMs bekannt. Die wichtigsten ADAM-Proteine sind ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM17, ADAM17, ADAM22 und ADAM23, da bei diesen auch eine variable Genexpression im Nervensystem vorliegt. Alle Proteine, die zu dieser Familie gehören, haben multifunktionale Aufgaben im Bereich des Nervensystems. Die wichtigsten davon sind die Entwicklung, die Kommunikation und Plastizität des Nervensystems. Wobei ADAM22 und ADAM23 primär für die direkte Zell-Zell Signalisierung verantwortlich sind (Benaroch 2012).

PLEKHM 3

"Pleckstrin homolgy domain, family M, member 3" (PLEKHM3) ist ein proteincodierendes Gen auf der Basenpaarposition 96,532,557 bis 96,749,397 (NCBI 2014).

Es gehört zu der Gruppe "Pleckstrin homology (PH) domain". PH sind kleine Proteinmodule mit etwa 120 Aminosäuren. Sie sind häufig in der intrazellulären Kommunikation und Prozessen der Organisation des Zytoskeletts involviert (Pawson 1998).

PTH2R

"Parathyroid hormone 2 receptor" (PTH2R) ist ein proteincodierendes Protein und befindet sich auf dem Genom des Rindes von 97,098,843 bis 97,182,875 (NCBI 2014).

Der Rezeptor PTH2R gehört zu der sehr kleinen Parathormon-Gen-Familie (Papasani et al. 2004).

Bei Säugetieren gibt es zwei PTH Rezeptor-Gene (PTH1R und PTH2R). Eine Funktion dieser beiden Gene ist die Sekretierung von Kalzium aus den Knochen und die weitere ist die Beförderung von Kalzium in das Blut. Jedoch ist noch sehr wenig bekannt über die Funktion des PTH2/PTH2R Systems in der Entwicklung bei Tieren (Bhattacharya et al. 2011).

MAP2

"Microtubule associated protein 2" (MAP2) ist ein proteincodierendes Gen. Dessen genaue Position ist 97,693,718 bis 97,991,789.(NCBI 2014)

MAP2 liegt in mehreren Isoformen vor und schließt sich den "microtubule-associated-proteins" an (Bhat et al. 2006).

Map2 hat neben anderen Funktionen die Aufgabe, Mikrotubuli zu binden und sie zu stabilisieren (Ferralli et al. 1994).

UNC80

UNC-80 ist ein proteincodierendes Gen auf der Position 98,024,490 bis 98,254,570. (NCBI 2014)

UNC-80 bedeutet "uncoordinated gene 80" (Jospin et al. 2007).

Bei der Analyse ROH weist das Chromosom 2 siebenundzwanzig signifikante Bereiche auf. Zu diesen Bereichen wurden 5 Gene gefunden, die auf derselben Position am Genom liegen. Die höchsten –neglog¹⁰ verlaufen durch die Gene ADAM

23 mit 4,043993074, PTH2R 4,458939178 und MAP2 4,240522968. Diese drei Gene sind über einem Wert von 4.

Die Literatursuche ergab kein direktes Indiz auf das Einwirken der Gene auf das Auge und dessen Umgebung.

Chromosom 6

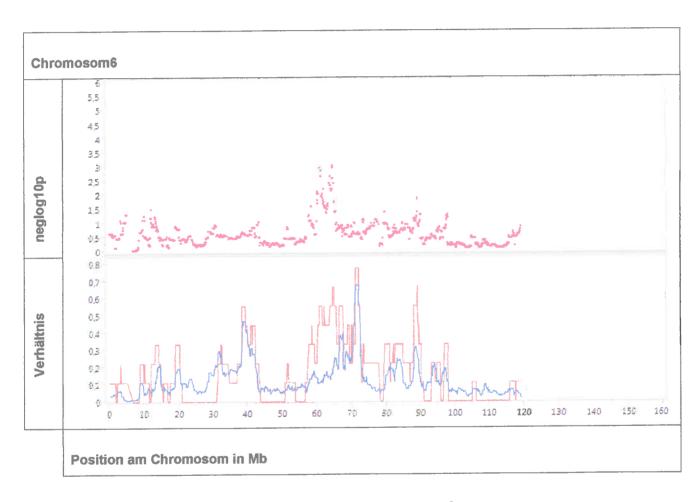


Abbildung 12: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 6

Auf dem Chromosom 6 wurde ebenfalls ein Bereich festgestellt, der eine Signifikanz von über 3 aufweist (Abbildung 12 und Tabelle 4). Die genaue Position ist von 64,641,399 bis 64,663,665 (NCBI 2014).

Nr.	Position am CHR	-neglog ¹⁰	Gen
1	64641399	3,022306978	KCTD8
2	64663665	3,022306978	KCTD8

Tabelle 4: p-Werte über 3 am CHR 6

KCTD8

Das "potassium channel tetramerisation domain containing 8" (KCTD8) ist ein proteincodierendes Gen mit der genauen Genomposition von 64,486,955 bis 64,751,608 (NCBI 2014).

KCTD8 gehört zu den Proteinen der "potassium channel tetramerizationdomain (KCTD) proteins", die insgesamt aus 26 verschiedenen Proteinen bestehen. Diese Familie wird weiterhin in 7 Gruppen von A-G geteilt. Unterschieden werden sie anhand ihrer Aminosäuren Sequenz. Das Gen KCTD8 gehört der Gruppe D an. Die meisten Funktionen dieser Proteine sind weitgehend unbekannt. In Human-Studien werden den KCTD Proteinen aber mehrere Aufgaben im Bereich der Protein-Protein Wechselwirkung zugeordnet. Zu diesen Aufgaben gehören (Liu et al. 2013) die Transskriptionsrepression (Mei et al. 2012) (Bayón et al. 2008), die Regelung des Zytoskeletts (Kang et al. 2004), die Tetramerisierung und Taktung von Ionenkanälen (Kreusch et al. 1998) (Minor et al. 2000) und die Interaktion mit dem Cullin E3 Ubiquitin-Ligase Komplex (Pintard et al. 2004).

Am Chromosom 6 wurde nur ein Gen identifiziert, welches durch einen signifikanten Bereich verläuft. Der –log p-Wert beträgt 3,022306978.

Chromosom 11

Die -log p-Werte am Chromosom 11 reichen bis 3,017806496 (Abbildung 13, Tabelle 5). Die Suche nach ihrer Funktion ergab keine Hinweise auf mögliche Einflüsse im Bereich der Augen.

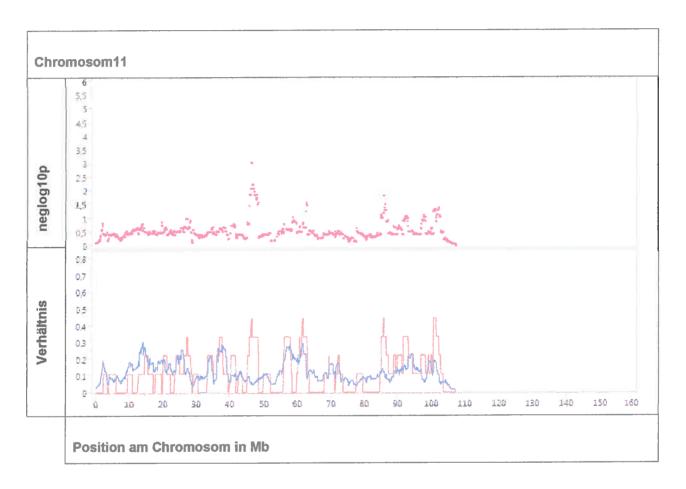


Abbildung 13: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 11

Nr.	Position am CHR	-neglog ¹⁰	Gen
1	46307696	3,017806496	NT5DC4
2	46340701	3,017806496	CKAP2L
3	46363109	3,017806496	
4	46406314	3,017806496	
5	46487959	3,017806496	IL37

Tabelle 5: p-Werte über 3 am CHR 11

NT5DC4

"5'nukleotidase domain containing 4" (NT5DC4) ist ein proteincodierendes Gen mit der Basenpaarposition von 46,302,194 bis 46,311,962 (NCBI 2014).

CKAP2L

"Cytoskeleton associated protein 2-like" (CKAP2L) ist ein proteincodierendes Gen. Es erstreckt sich von der Basenpaarposition 46,318,612 bis 46,340,859 (NCBI 2014).

Das Protein gehört zu den (MAP) "microtubule associated proteins" (Yumoto et al. 2013).

Die Funktionen des Gens CKAP2L sind aber noch weitgehend unbekannt (Cahan & Graubert 2010).

IL37

"Interleukin 37" (IL-37) ist auch bekannt unter IL-1F7 und ist ein proteincodierendes Gen. Es ist am Chromosom 11 an der Position 46,481,787 bis 46,488,798 (NCBI 2014).

IL-37 ist der Familie IL-1 angehörend. Das Gen IL-37 liegt in 5, von 5a bis 5e, verschiedenen Isoformen vor. Die Expression für die Formen a, b und c erfolgt in Lymphknoten, im Knochenmark, im Hoden, im Thymus, in der Plazenta, im Uterus, in der Haut, in Monozyten, in B-Lymphozyten, im Dickdarm und in Keratinozyten. Die Formen d und e expressieren nur in Hoden und Knochenmark, nur die Isoform a im Gehirn, die Form b in den Nieren und Isoform c im Herz (Boraschi et al. 2011).

Chromosom 12

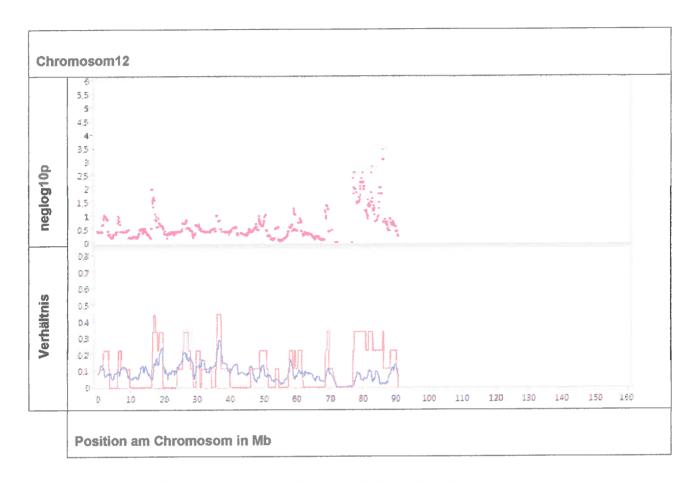


Abbildung 14: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 12

Nr.	Position am CHR	-neglog ¹⁰	Gen
1	85986433	3,073023518	
2	86048240	3,073023518	
3	86077889	3,432820857	
4	86114773	3,073023518	
5	86146208	3,073023518	
6	86222488	3,073023518	

Tabelle 6: p-Werte über 3 am CHR 12

Für die Bereiche mit hohen Wahrscheinlichkeitswerten am Chromosom 12 wurden auf der Genkartierung beim Rind keine Gene gefunden.

Chromosom 13

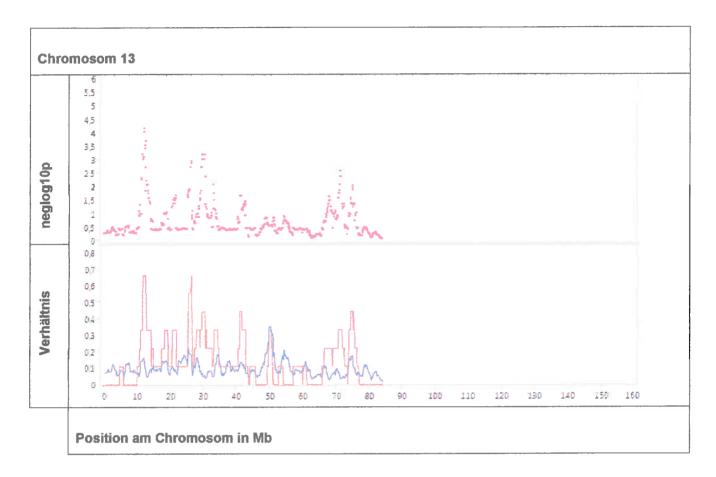


Abbildung 15: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 13

Nr.	Position am CHR	-neglog ¹⁰	Gen
1	29821617	3,017806496	SUV39H2
2	29841640	3,017806496	DCLRE1C
3	29876435	3,187872406	
4	29897763	3,187872406	MEIG1
5	30108205	3,187872406	FAM171A1
6	30197435	3,187872406	
7	30235320	3,187872406	
8	30310253	3,017806496	
9	30337948	3,017806496	
10	30480475	3,017806496	ITGA8
11	30530185	3,187872406	

Tabelle 7: p-Werte über 3 am CHR 13

SUV39H2

"suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosphila)" (SUV39H2) ist ein proteincodierendes Gen (Basenpaarposition 29,813,251 bis 29,837, 101) (NCBI 2014).

SUV39H2 ist dem Gen SUV39H1 im Aufbau und Funktion sehr ähnlich. Beide gehören der Familie SUV39 an (Dillon et al. 2005).

SUV39H2 und SUV39H1 spielen eine dominante Rolle in der Bildung des Chromatin. (Patnaik et al. 2004).

Außerdem schreibt (Jagannathan et al. 2013), dass es Hinweise gibt, dass das Gen SUV39H2 eine Bedeutung in der Differenzierung von Keratinozyten hat.

DCLRE1C

"DNA cross-link repair 1C" (DCLRE1C) ist ein proteincodierendes Gen mit der Basenpaarposition von 29,840,390 bis 29,874,417 am Chromosom 13 (NCBI 2014). Das Gen DCLRE1C wird auch ARTEMIS genannt (Schuetz et al. 2014).

MEIG1

"Meiosis expressed gene 1 homolog" (MEIG1) ist ein proteincodierendes Gen. Es ist am Chromosom 13 mit der Position von 29,882,026 bis 29,898,675 (NCBI 2014). MEIG1 ist ein Protein, das in der Meiose eine Rolle spielt. Bei Mäusen wurde dem proteincodierenden Gen MEIG1 eine Mitwirkung bei der Entwicklung von Keimzellen zugeschrieben (Teves et al. 2013)(Steiner et al. 1999).

FAM171A1

"Family with sequence similarity 171, member A1" ist ein proteincodierendes Gen und ist auch unter der Bezeichnung "C13H10ORF38" bekannt. Es liegt am Chromosom 13 auf der genauen Position 30,067,761 bis 30,123,390 (NCBI 2014).

ITGA8

"Integrin, alpha 8" (ITGA8) ist ein proteincodierendes Gen. Es ist am Chromosom 13 von 30,338,789 bis 30,528,328 positioniert (NCBI 2014).

Die Integrine gehören einer großen Familie der Oberflächenintegrinmoleküle an. Sie dienen als Rezeptoren für extrazellulärer-matrix-Moleküle. Außerdem wirken sie bei der Blutgerinnung mit ein (Hynes 2002).

Weitere Funktionen haben die Integrine bei der Wundheilung und der Immunantwort. (Adams & Watt 1993).

Am Chromosom 13 wurden 11 signifikante Stellen analysiert, die zu 5 Genen führten (Abbildung 15, Tabelle 7). Ein genetischer Hintergrund der Gene in Bezug auf das Augenlid wurde jedoch nicht gefunden.

Chromosom19

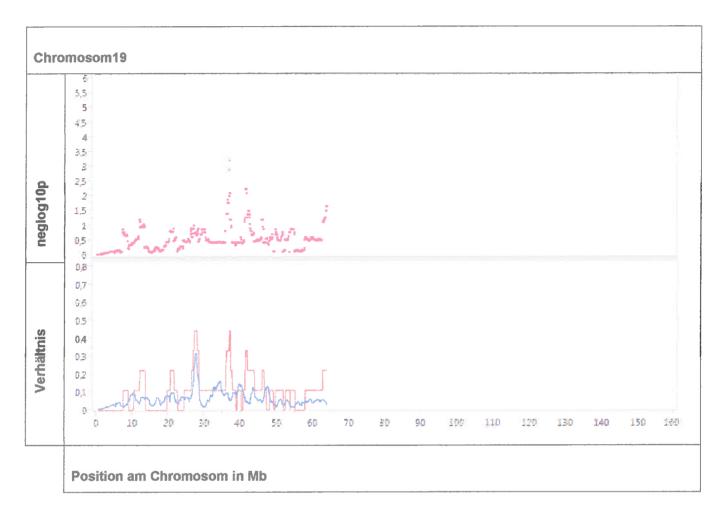


Abbildung 16: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 19

Nr.	Position am CHR	-neglog ¹⁰	Gen
1	37035051	3,187872406	
2	37099312	3,187872406	COL1A1

Tabelle 8: p-Werte über 3 am CHR 19

COL1A1

"Collagen, type 1, alpha 1" (COL1A1) ist ein proteincodierendes Gen mit der Position 37,088,232 bis 37,106,182 auf dem Chromosom 19 (NCBI 2014).

Auf Chromosom 19 (Abbildung 16, Tabelle 8) wurden 2 signifikante Bereiche festgestellt, die durch ein Gen verlaufen. Für CLO1A1 ist keine Funktion in Zusammenhang mit Augen bekannt.

Chromosom 21

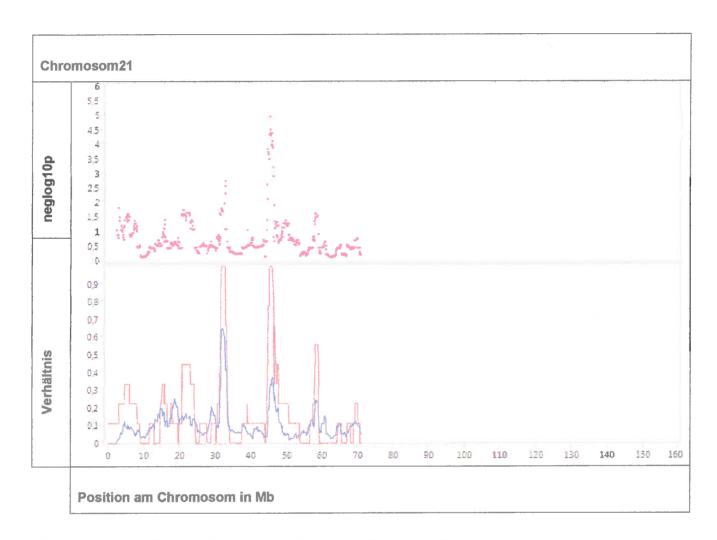


Abbildung 17: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 21

Nr.	Position am CHR	-neglog ¹⁸	Gen
1	44836875	3,816671044	
2	44862140	3,729134333	
3	44928899	3,729134333	
4	44981955	3,729134333	
5	45019363	3,644432402	
6	45096714	3,482901166	
7	45151868	4,32431639	
8	45194584	4,941029358	
9	45275915	4,941029358	
10	45310522	4,941029358	SPTSSA
11	45333059	4,498067154	
12	45417602	4,360907455	
13	45475858	4,360907455	
14	45530619	4,294091293	
15	45720539	4,360907455	
16	45804647	3,976139631	PPP2R3C
17	45910348	3,976139631	KIAA0391
18	45982185	4,100234192	PSMA6
19	46018333	3,915539188	
20	46040262	3,915539188	
21	46116868	3,855863977	
22	46145471	3,209227302	

Tabelle 9: p-Werte über 3 am CHR 21

SPTSSA

"Serine palmitoyltransferase, small subunit A" (SPTSSA) ist auch noch bekannt unter den Bezeichnungen "ssSPTa", "C14orf147" und "C21H14orf147". Es ist ein proteincodierendes Gen mit der genauen Position von 45,302,735 bis 45,321,878 am Chromosom 21. (NCBI 2014)

Das Gen SPTSSA, ebenfalls ssSPTa genannt, ist eine Untereinheit der Gen-Familie SPT (serine palmitoytransferase) (Finzi-hart et al. 2009).

PPP2R3C

"Protein phosphatase 2, regulatory subunit B", gamma" (PPP2R3C) wird auch "C14orf10" genannt und ist am Chromosom 21 von 45,794,781 bis 45,820,504. Es ist ein proteincodierendes Gen (NCBI 2014).

PPP2R3C ist eine regulatorische Untereinheit der "protein phosphatase 2 A" (PP2A) (Sacco et al. 2014).

KIAA0391

"Kiaa0391 ortholog" (KIAA0391) ist ein proteincodierendes Gen am Chromosom 21. Die Position ist von 45,820,622 bis 45,953,662 (NCBI 2014).

PSMA6

"Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6" (PSMA6) ist ein proteincodierendes Gen an der Position 45,974,822 bis 45,998,595 am Chromosom 21 (NCBI 2014).

Bei der letzten Analyse der ROH wurden sehr hohe –neglog¹⁰ Werte erhoben. Bei 22 Bereichen über 3 war die Position, die durch das Gen SPTSSA verlauft, am höchsten mit einem –neglog¹⁰ von 4,941029358. Keines dieser Gene ergab bei der Recherche einen Hinweis auf den Zusammenhang mit dem Bereich der Augen.

Diskussion und Schlussfolgerung

Anhand der Single SNP Analyse, einem linearen Modell zur Berechnung von Effekt und Größe der einzelnen Nukleotid-Polymorphismen (SNPs), sollte geprüft bzw. dargestellt werden, welche SNPs mit der Krankheit Entropium assoziiert werden können.

Die Daten haben gezeigt, dass eine Durchführung der Assoziationsstudie ohne Berücksichtigung der Populationsstrukturen keine aussagekräftigen Ergebnisse erbringen. Durch den Ausschluss dieser populationsspezifischen Strukturen haben sich bei der Analyse (ohne der unsicheren Fälle) 13 SNPs mit einem -log p-Wert von über 5,5 gezeigt. Des weiteren wurde ein SNP gefunden, der einen errechneten -log p-Wert von 6,99 aufwies. Dieser SNP liegt auf dem Chromosom 22. Diese Position ist am Gen ITGA9. In mehreren wissenschaftlichen Artikeln wird dieses Gen mit der Entwicklung der Augenlider bei Mäusen in Verbindung gebracht. Der Einfluss des Gens auf den Umgebungsbereich des Auges wird in einem weiteren Artikel nicht ausgeschlossen.

Die Ergebnisse sprechen also für die Überlegung, dass dieses Gen eine eventuelle Rolle bei der Entwicklung des Augenlides spielt und somit mit der Ausprägung der Krankheit Entropium (Rolllid) in Verbindung gebracht werden kann.

Bei der weiteren Untersuchung mit der Single SNP Analyse, unter Einbezug der unsicheren Fälle, zeigte sich ein SNP am Chromosom 6 mit einem p-Wert von 7,06. Dieser SNP ist an der Position des Gens KCNIP4. Zu diesem Gen wurde keine Literatur gefunden, die auf den Bereich der Augen hinweist oder in Verbindung mit der Krankheit gebracht werden könnte. Das sollte jedoch nicht zur völligen Ausschließung in weiteren Überlegungen führen.

Bei der Durchführung der Run of Homozygosity, einer Analyse zur Feststellung von homozygoten Bereichen am Genom, war es das Ziel, die homozygoten Teilbereiche der erkrankten Tiere aufzuzeigen. Die homozygoten Strecken wurden genau lokalisiert und die daraus gefundenen Gene sollten einen eventuellen genetischen Hintergrund der Krankheit aufzeigen.

Insgesamt wurden an den Chromsomen 2, 6, 11, 12, 13, 19 und 21, den Kriterien entsprechende, homozygote Bereiche gefunden. 75 SNPs aus den 7 Chromosomen waren signifikant auf einem nicht sehr strengen Niveau (P<0.001 ohne Berücksichtigung der multiplen Test-Situation) und zeigten auf der Genkartierung 19 Gene.

Zu den gefundenen Genen wurde keine Literatur gefunden, die einen Hinweis auf den Zusammenhang mit den Augen oder deren Umgebung lieferten.

Die Single SNP Analyse, unter Ausschluss der unsicheren Fälle, zeigte einen Bereich, der mit sehr hoher Signifikanz und vorhandenen wissenschaftlichen Arbeiten, auf den Bereich der Augen hinwies. Dieses Ergebnis spricht für die Theorie, dass hier ein genetischer Hintergrund vorhanden ist. Für die weiteren Analysen wurde kein direkter Hinweis auf genetische Hintergründe der Krankheit gefunden. Man muss jedoch bei allen Analyseergebnissen berücksichtigen, dass die Anzahl der erkrankten Tiere (9) eine sehr kleine Stichprobe ergab. Für sichere Ergebnisse wäre eine höhere Anzahl an Fällen und Kontrolltieren erforderlich. Außerdem gestaltete sich die Diagnostizierung der Krankheit problematisch. Die vormals 19 Tiere mit der Erkrankung reduzierten sich auf 9, da eine sichere Diagnostizierung auf Entropium nicht gegeben war und 10 Stiere als unsichere Fälle behandelt wurden.

Die Recherche zum Thema Entropium oder auch Ectropium stellte sich als schwierig heraus da noch sehr wenig wissenschaftliche Literatur in Hinblick auf den genetischen Hintergrund vorhanden ist.

Die fehlende Unterstützung und Bestätigung der Literatur sollte keine vollkommene Ausschließung sein. In dieser Studie wurden jedoch keine Zusammenhänge gefunden. Alle Daten stammen aus einer regionalen Zuchtorganisation in Österreich. Zur besseren Analyse der Genetik des Entropiums beim Fleckvieh wird zu einer größeren Studie unter Einbezug von vielen Tieren in Österreich, Deutschland, Italien, Tschechien und Slowenien geraten.

Literaturverzeichnis

- Adams, J.C. & Watt, F.M., 1993. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development (Cambridge, England)*, 117(4), pp.1183–98. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8404525.
- Banks, K.G., 1999. MAPPING GAPING LIDS: A MUTATION CAUSING OPEN EYELIDS AT BIRTH IN MOUSE by KATHLEEN GRACE BANKS B. Sc, The University of British Columbia in association with the University College of the Cariboo, 1996. A THESIS SUMBITTED IN PARTIAL FULFILLMENT., (November).
- Bayón, Y. et al., 2008. KCTD5, a putative substrate adaptor for cullin3 ubiquitin ligases. *The FEBS journal*, 275(15), pp.3900–10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573101 [Accessed June 21, 2014].
- Bhat, K.M.R. et al., 2006. Transcriptional regulation of human MAP2 gene in melanoma: role of neuronal bHLH factors and Notch1 signaling. *Nucleic acids research*, 34(13), pp.3819–32. Available at:

 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1540725&tool=pmcentrez&rendertype =abstract [Accessed June 21, 2014].
- Bhattacharya, P. et al., 2011. Evolution of the vertebrate pth2 (tip39) gene family and the regulation of PTH type 2 receptor (pth2r) and its endogenous ligand pth2 by hedgehog signaling in zebrafish development. *The Journal of endocrinology*, 211(2), pp.187–200. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3192934&tool=pmcentrez&rendertype =abstract [Accessed June 20, 2014].
- Boraschi, D. et al., 2011. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *European cytokine network*, 22(3), pp.127–47. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22047735 [Accessed June 16, 2014].
- Cahan, P. & Graubert, T. a, 2010. Integrated genomics of susceptibility to alkylator-induced leukemia in mice. *BMC genomics*, 11(1), p.638. Available at:

 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3018144&tool=pmcentrez&rendertype =abstract [Accessed June 22, 2014].
- Dillon, S.C. et al., 2005. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases.

 Genome biology, 6(8), p.227. Available at:

 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1273623&tool=pmcentrez&rendertype
 =abstract [Accessed May 23, 2014].

- Ferenčaković, M., Sölkner, J. & Curik, I., 2013. Estimating autozygosity from high-throughput information: effects of SNP density and genotyping errors. *Genetics, selection, evolution: GSE*, 45, p.42. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24168655 [Accessed February 20, 2014].
- Ferralli, J., Doll, T. & Matus, a, 1994. Sequence analysis of MAP2 function in living cells. *Journal of cell science*, 107 (Pt 1, pp.3115–25. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7699010.
- Finzi-hart, J.A. et al., 2009. Correction for Finzi-Hart et al., Fixation and fate of C and N in the cyanobacterium Trichodesmium using nanometer-scale secondary ion mass spectrometry. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(24), pp.9931–9931. Available at: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0904281106 [Accessed August 22, 2014].
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines In their roles as major adhesion receptors, integrins., 110(Table 1), pp.673–687.
- Jagannathan, V. et al., 2013. A mutation in the SUV39H2 gene in Labrador Retrievers with hereditary nasal parakeratosis (HNPK) provides insights into the epigenetics of keratinocyte differentiation.

 PLoS genetics, 9(10), p.e1003848. Available at:

 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3789836&tool=pmcentrez&rendertype =abstract [Accessed June 23, 2014].
- Jospin, M. et al., 2007. UNC-80 and the NCA ion channels contribute to endocytosis defects in synaptojanin mutants. *Current biology: CB*, 17(18), pp.1595–600. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17825559 [Accessed June 21, 2014].
- Kang, M.-I. et al., 2004. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), pp.2046–51. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=357049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.
- Klei, L. et al., 2011. GemTools: a fast and efficient approach to estimating genetic ancestry Motivation: Availability: Contact:, pp.1–5.
- Limviphuvadh, V. et al., 2010. Is Lgi2 the Candidate Gene for Partial Epilepsy With Pericentral Spikes? *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 08(01), pp.117–127. Available at: http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0219720010004550 [Accessed September 4, 2014].

- Liu, Z., Xiang, Y. & Sun, G., 2013. The KCTD family of proteins: structure, function, disease relevance. Cell & bioscience, 3(1), p.45. Available at:

 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3882106&tool=pmcentrez&rendertype
 =abstract.
- Luiz, J. et al., 1999. PRIMARY ENTROPION IN PERSIAN CATS., pp.737-740.
- Marchini, J. et al., 2004. The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nature genetics*, 36(5), pp.512–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15052271 [Accessed February 20, 2014].
- Marden, J.I., 2004. Positions and QQ Plots. *Statistical Science*, 19(4), pp.606–614. Available at: http://projecteuclid.org/Dienst/getRecord?id=euclid.ss/1113832725/ [Accessed February 20, 2014].
- Minor, D.L. et al., 2000. The polar T1 interface is linked to conformational changes that open the voltage-gated potassium channel. *Cell*, 102(5), pp.657–70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007484.
- NCBI, N.C. for B.I., 2013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ [Accessed February 16, 2014].
- Papasani, M.R. et al., 2004. Identification and characterization of the zebrafish and fugu genes encoding tuberoinfundibular peptide 39. *Endocrinology*, 145(11), pp.5294–304. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15297442 [Accessed June 20, 2014].
- Patnaik, D. et al., 2004. Substrate specificity and kinetic mechanism of mammalian G9a histone H3 methyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 279(51), pp.53248–58. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15485804 [Accessed June 23, 2014].
- Pintard, L., Willems, A. & Peter, M., 2004. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *The EMBO journal*, 23(8), pp.1681–7. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract [Accessed June 21, 2014].
- Sacco, F. et al., 2014. Combining affinity proteomics and network context to identify new phosphatase substrates and adapters in growth pathways. *Frontiers in genetics*, 5(May), p.115. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4019850&tool=pmcentrez&rendertype =abstract [Accessed September 3, 2014].
- Schuetz, C. et al., 2014. TRANSPLANTATION SCID patients with ARTEMIS vs RAG de fi ciencies following HCT: increased risk of late toxicity in ARTEMIS-de fi cient SCID., 123(2), pp.2–4.

- Steiner, R., Ever, L. & Don, J., 1999. MEIG1 localizes to the nucleus and binds to meiotic chromosomes of spermatocytes as they initiate meiosis. *Developmental biology*, 216(2), pp.635–45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10642798.
- Stepp, M. a, 1999. Alpha9 and beta8 integrin expression correlates with the merger of the developing mouse eyelids. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 214(3), pp.216–28. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10090148.
- Stepp, M. a. et al., 1995. Localized distribution of alpha 9 integrin in the cornea and changes in expression during corneal epithelial cell differentiation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 43(4), pp.353–362. Available at: http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/43.4.7534781 [Accessed February 20, 2014].
- Strunk, R.C. et al., 2013. Digital Commons @ Becker Integration of mouse and human genome-wide association data identifies KCNIP4 as an asthma gene Integration of Mouse and Human Genome-Wide Association Data Identifies KCNIP4 as an Asthma Gene.
- Teves, M.E. et al., 2013. Germ cell-specific disruption of the Meig1 gene causes impaired spermiogenesis in mice. *Andrology*, 1(1), pp.37–46. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4120260&tool=pmcentrez&rendertype =abstract [Accessed September 2, 2014].
- Truong, T. et al., 2011. Novel characterization of lymphatic valve formation during corneal inflammation. *PloS one*, 6(7), p.e21918. Available at:

 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3131394&tool=pmcentrez&rendertype =abstract [Accessed September 4, 2014].
- Yumoto, T. et al., 2013. Radmis, a novel mitotic spindle protein that functions in cell division of neural progenitors. *PloS one*, 8(11), p.e79895. Available at:

 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3832648&tool=pmcentrez&rendertype =abstract [Accessed June 3, 2014].

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Manhattan-Farb-Grafik ohne Berücksichtigung der Populationsstruktur und unter Ausschluss der unsicheren Fälle8
Abbildung 2: Q-Q-Grafik ohne Berücksichtigung der Populationsstruktur und unter Ausschluss der unsicheren Fälle9
Abbildung 3: Manhattan-Farb-Grafik ohne Berücksichtigung der Populationsstrukturen und unter Einbezug der unsicheren Fälle10
Abbildung 4: Q-Q-Grafik ohne Berücksichtigung der Populationsstrukturen und unter Einbezug der unsicheren Fälle
Abbildung 5: Mannhatten-Farb-Grafik unter Berücksichtigung der Populationsstruktur und unter Ausschluss der unsicheren Fälle12
Abbildung 6: Q-Q-Grafik unter Berücksichtigung der Populationsstruktur und unter Ausschluss der unsicheren Fälle
Abbildung 7: Gen ITGA 915
Abbildung 8: Manhattan-Farb-Grafik unter Berücksichtigung der populationsspezifischen Faktoren und im Einbezug der unsicheren Fälle
Abbildung 9: Q-Q-Grafik unter Berücksichtigung der populationsspezifischen Faktoren und mit Einbezug der unsicheren Fälle
Abbildung 10: Gen KCNIP420
Abbildung 11: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 222
Abbildung 12: Verhältnis der homozvgoten Strecken auf Chromosom 626

Abbildung 13: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 1128
Abbildung 14: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 1230
Abbildung 15: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 1331
Abbildung 16: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 1934
Abbildung 17: Verhältnis der homozygoten Strecken auf Chromosom 2136
Tabellenverzeichnis
Tabelle 1: Detaillierte Beschreibung der SNPs
Tabelle 2: Detaillierte Beschreibung der SNPs
Tabelle 3: p-Werte über 3 am CHR 2
Tabelle 4: p-Werte über 3 am CHR 6
Tabelle 5: p-Werte über 3 am CHR 11
Tabelle 6: p-Werte über 3 am CHR 12
Tabelle 7: p-Werte über 3 am CHR 13
Tabelle 8: p-Werte über 3 am CHR 1934
Tabelle 9: p-Werte über 3 am CHR 21

Fotoverzeichnis

Foto 1: Veränderung des Augapfels	2
Foto 2: Rolllid	2
Foto 3: Veränderung des Augapfels	2
Foto 4: Verlust des Augapfels	2