



## **Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm**

AgroClustEr: FoCus – Food Chain Plus –  
Genetische Variabilität und funktionelle Milchhaltsstoffe (Teilprojekt A)

**Förderkennzeichen** 0315539A

**TP 3.1 LactoGene** Genetische Variabilität von Milchproteinen und der Milchproteinzusammensetzung im Hinblick auf funktionelle Milchhaltsstoffe

**Teilprojektleiter:** Prof. Dr. Georg Thaller

**Zuwendungsempfänger:** Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24098 Kiel

**Ausführende Stelle:** Christian-Albrechts-Universität zu Kiel – Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät – Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Olshausenstr. 40, 24118 Kiel

**Projektleitung:** Herr Prof. Dr. Thaller

**Projektlaufzeit:** 1.4.2010 bis 30.9.2015

Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315539A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

## 1. Kurzdarstellung

### 1.1. Aufgabenstellung

In den letzten Jahren sind Milchproteine aufgrund ihres Einflusses nicht nur auf den ernährungsphysiologischen Wert der Milch sondern auch auf verarbeitungstechnologische Eigenschaften von Milchprodukten in den Focus des wirtschaftlichen Interesses gelangt. Von besonderem ernährungs- und lebensmittelwissenschaftlichem Interesse sind bioaktive Peptide, die als enzymatische Spaltprodukte von Milchproteinen während der Verdauung oder der Verarbeitung entstehen. Wichtige Effekte, die den bioaktiven Peptiden zugeschrieben werden, lassen sich mit Begriffen wie „antimikrobiell“, „immunmodulatorisch“, „tumorsuppressiv“, „antioxidativ“ oder „antihypertensive“ umschreiben.

Die Proteinfraction der Milch von Wiederkäuern besteht zu 90 % aus sechs Hauptmilchproteinen, die in vier Kaseine ( $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -,  $\alpha_{S2}$ - und  $\kappa$ -Kasein) und zwei Molkenproteine ( $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin) unterteilt werden können. Beim Pferd kommt noch ein weiteres  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lactoglobulin II) zur Molkenproteinfraction hinzu. Von allen Milchproteinen ist bekannt, dass sie in unterschiedlichen Varianten sowohl beim Rind als auch bei Schaf und Pferd vorkommen. Diese Varianten sind meist das Resultat sogenannter Nukleotid austausche innerhalb ihrer Gene (*CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2*, *CSN3*, *LAA* und *LGB*), die zu Aminosäureaustauschen auf Proteinebene führen. Viele dieser Varianten üben nicht nur Einflüsse auf Milchleistungsmerkmale und –zusammensetzung aus, sondern auch auf den nutritiven Wert der Milch. Die Entstehung bioaktiver Peptide ist von der vorhandenen Aminosäuresequenz der Milchproteine abhängig und somit durch die Ausprägung verschiedener Varianten beeinflussbar. Des Weiteren stellen die verschiedenen Milchproteinvarianten ein interessantes Hilfsmittel für phylogenetische Studien dar.

Die Arbeitsschwerpunkte im Teilprojekt TP3.1 waren es daher neue, aber auch bereits bekannte Milchproteinvarianten in verschiedenen Rinder-, Schaf- und Pferderassen auf DNA-Ebene zu identifizieren. Aufbauend hierauf können Strategien entwickelt werden, um auf züchterischem Wege die Milchproteinzusammensetzung dahingehend zu beeinflussen, dass Milch mit einem spezifischen Muster an Proteinvarianten als Rohstoff für die Erzeugung bestimmter funktioneller Milchprodukte zur Verfügung gestellt werden kann. Folgende Aufgabenstellungen wurden hierfür konkret bearbeitet:

- Akquirierung von Blut-, Harr oder Wollproben der Nutztierspezies Rind, Schaf und Pferd, Extraktion der DNA und Sequenzierung der Milchproteingenorte.
- Erstellung eines Varianteninventars in unterschiedlichen Rassen.
- Validierung ausgewählter Varianten auf Transkript- und Proteinebene.
- In silico-Ableitung potenzieller bioaktiver Peptide aus unterschiedlichen Varianten.
- Bewertung der Ergebnisse und Evaluierung von Testverfahren sowie Entwicklung möglicher zuchtplanerischer Ansätze

### 1.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Seit frühesten Zeiten wissen Menschen um den Wert der Milch von Rindern, Schafen und Pferden als Nahrungsquelle. Heutzutage spielt, speziell in den westlichen Ländern, die Milch von Kühen eine wichtige Rolle in der Humanernährung. Dabei konnte eine beträchtliche Steigerung der Milchmenge pro Kuh durch züchterische Maßnahmen innerhalb der letzten Jahrzehnte erreicht werden. Die züchterische Verbesserung spezieller Eigenschaften oder Inhaltsstoffe der erzeugten Produkte spielte jedoch bisher eine untergeordnete Rolle. Das Verlangen des Verbrauchers nach funktionellen und insbesondere nach gesunden Lebensmitteln wird jedoch zunehmend stärker. Ein einfaches Beispiel dafür sind Lebensmittelunver-

träglichkeiten. Laktoseintoleranz oder Milchproteinallergien verursachen bei betroffenen Menschen einen hohen Leidensdruck durch den vollkommenen Verzicht auf Milchprodukte. Während sich für die Erzeugung laktosefreier Milch technische Lösungen anbieten, könnte die Erzeugung hypoallergener Milch auf züchterischem Wege eine vielversprechende Alternative sein. Vor dem Hintergrund einer gleichzeitig angespannten Milchmarktsituation, ergibt sich durch die Zucht auf bestimmte Inhaltsstoffe, die Möglichkeit Nischen des Milchmarktes zu nutzen. Das große Potential sogenannter Milchproteinvarianten ist seit längerem bekannt und wird bereits in einigen Ländern genutzt.

Im Gegensatz zu Kuh-, oder Schafmilch stellt Stutenmilch ein eher außergewöhnliches Nahrungsmittel dar, nicht zuletzt der aufwendigen Produktion geschuldet. Gleichwohl wird die Verwendung von Stutenmilch seit Jahrhunderten geschätzt. Stutenmilch hat eine sehr gute nutritive Wertigkeit mit einer hervorragenden Proteinzusammensetzung, welche der Proteinzusammensetzung menschlicher Milch ähnelt. Weiterhin kann Stutenmilch die Gesundheit des Menschen positiv beeinflussen und wird daher hauptsächlich in der Naturheilkunde als Heilmittel für verschiedene Krankheiten eingesetzt. Erste wissenschaftliche Belege für die Wirksamkeit der Stutenmilch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Neurodermitis und kardiovaskulären Erkrankungen konnten in den letzten Jahren erbracht werden, der genaue Wirkmechanismus dieser Milch ist dagegen bis heute unbekannt. Die Milch von Pferden wird auch als hypoallergenes Lebensmittel im Falle einer Kuhmilchproteinallergie (CMA) genutzt.

### 1.3. Planung und Ablauf

Das Vorhaben wurde im Rahmen des BMBF-Kompetenznetzwerks Food Chain Plus (FoCus) durchgeführt. Der Arbeitsplan gliederte sich in zwei Arbeitspakete. Arbeitspaket 1 beinhaltete die Akquisition von Probenmaterial der Spezies Rind und Schaf sowie die Erfassung bekannter und neuer Proteinvarianten innerhalb dieser beiden Spezies.

Arbeitspaket 2 umfasste die Akquisition von Probenmaterial der Spezies Pferd und ebenfalls die Bestimmung bekannter und neuer Proteinvarianten dieser Spezies. Die Ergebnisse aus diesem Teil beider Arbeitspakete wurden anschließend genutzt um Allelfrequenzen zu schätzen sowie populationsgenetische und zuchtplanerische Fragestellungen zu bearbeiten. Außerdem wurden aus den erzeugten Sequenzinformationen *in silico* die aus den Varianten durch unterschiedliche Behandlung erzeugbaren bioaktiven Peptide abgeleitet.

Bei regelmäßigen Projekttreffen des Verbundes wurde jeweils der Stand des Teilprojekts vorgestellt und diskutiert sowie das weitere Vorgehen abgestimmt. Es fand auch eine Vielzahl informativer Treffen einzelner Projektpartner bezüglich spezifischer Fragestellungen statt sowie ein Wissensaustausch auf verschiedenen Ebenen statt. Die Projektpartner wurden sowie der Koordinator wurden stets über den aktuellen Sachstand des Projekts, insbesondere über Gespräche mit dem Projektträger und Modifikationen des Arbeitsprogramms unterrichtet.

Die Arbeiten an der CAU Kiel wurden von folgenden Personen durchgeführt:

- Projektleiter TP3.1: Prof. Dr. Georg Thaller/Priv.-Doz. Dr. Jens Tetens
- Tierauswahl und administrative Tätigkeiten: Priv.-Doz. Dr. Jens Tetens
- Koordination der Laborarbeiten und Probenakquise: Priv.-Doz. Dr. Jens Tetens, Julia Louisa Tetens, Julia Brinkmann
- DNA-Aufbereitung, Sequenzierung, Laborarbeiten: Julia Louisa Tetens, Julia Brinkmann

- Methodenentwicklung, Statistik, Auswertung: Priv.-Doz. Dr. Jens Tetens, Prof. Dr. Georg Thaller, Julia Tetens, Julia Brinkmann, Claas Heuer
- Publikationen: Julia Tetens, Julia Brinkmann unter Mithilfe aller Beteiligten
- Entwicklung / Bewertung PCR-basierter Milchtestverfahren im Rahmen eines Laborpraktikums: M.Sc. Iulia Blaj

#### 1.4. Wissenschaftlicher Kenntnisstand zu Beginn des Vorhabens

Die Untersuchungen knüpften an den im Antrag ausführlich dargelegten und in der wissenschaftlichen Fachliteratur frei zugänglichen Stand der Wissenschaft und Technik an. Es wurden keine bekannten Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte für die Durchführung des Vorhabens benutzt. Die verwendete Fachliteratur ist im beigefügten Literaturverzeichnis sowie in den beigefügten Publikationen angegeben. Es wurden die fachspezifisch ausgewiesenen Informations- und Dokumentationsdienste, z.B. PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) verwendet.

#### 1.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Arbeiten erfolgten überwiegend in enger Zusammenarbeit mit den einzelnen Partnern innerhalb des Verbundprojektes. Hervorzuheben sind dabei folgende Kooperationen:

- **Analyse von Lactoglobulinvarianten beim Angler Rind.** In einer Kooperation mit der Abteilung Lebensmitteltechnologie (Prof. Schwarz, Projekt LactoTrans) wurden Angler Kühe mit bestimmten  $\beta$ -Lactoglobulinvarianten (LGB<sup>\*C</sup>) identifiziert und es wurde Milch verschiedener Tiere und Rassen beschafft. Es wurden Analysen zur Auswirkung dieser Varianten auf Milchleistungsmerkmale durchgeführt, die jedoch nicht nachgewiesen werden konnten.
- **In-silico Bewertung bioaktiver Sequenzen.** Am Max-Rubner-Institut (Prof. Meisel, Projekt LactoPep) wurde ein neues bioaktives Peptid identifiziert. Unterschiedliche  $\beta$ -Casein Varianten wurden auf das Vorkommen untersucht. Die Ergebnisse sind in der Dissertationsschrift von Frau Dr. Tetens dargelegt.
- **Validierung einer strukturellen  $\alpha$ S<sub>2</sub>-Casein-Variante beim Pferd.** In Zusammenarbeit mit der Abteilung Lebensmitteltechnologie (Prof. Schwarz, Projekt LactoTrans) sowie dem Institut für Experimentelle Medizin (Prof. Tholey) wurde eine equine Caseinvariante auf Transkript- und Proteinebene validiert. Die Ergebnisse wurden in PLoS ONE veröffentlicht.

Im Weiteren wurde im Rahmen wissenschaftlicher Kooperationen mit folgenden Einrichtungen zusammengearbeitet:

- Institut für Genetik, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, Prof. Dr. Cord Drögemüller / Prof. Dr. Tosso Leeb: Probenbereitstellung, Datenbereitstellung
- Nationalgestüt Avenches, Schweiz, Dr. Stefan Rieder: Datenbereitstellung
- Institut für Tierzucht Uni Hohenheim, Prof. Dr. Jörn Bennewitz: Probenbereitstellung
- Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, Uni Göttingen, Dr. Saber Quanbari: Probenbereitstellung
- Fachgebiet Tierzucht, Uni Kassel, Dr. Eduardo Pimentel: Probenbereitstellung

## 2. Eingehende Darstellung

### 2.1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse einschließlich Vergleich mit den vorgegebenen Projektzielen

#### *DNA-basierte Identifizierung neuer Varianten beim Rind*

Wesentliche Ziele des Verbundprojektes 3 sind die Identifizierung gesundheitsfördernder Inhaltsstoffe von Milch und Milchprodukten sowie mit deren Nutzbarmachung in funktionellen Milchprodukten. Die große Variabilität der Hauptmilchproteine ( $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -,  $\alpha_{S2}$ - und  $\kappa$ -Kasein,  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin) kann die Freisetzung sogenannter bioaktiver Peptide beeinflussen und so den Gehalt gesundheitsfördernder Inhaltsstoffe mitbestimmen. Es war daher das Ziel dieses Teilprojektes, bereits bekannte Milchproteinvarianten zu charakterisieren und neue Formen in verschiedenen Rinder-, Schaf- und Pferderassen zu identifizieren.

Bisher fand die Identifizierung neuer Proteinvarianten in den meisten Studien vorwiegend auf Proteinebene statt und wurde abschließend meist nur auf DNA-Ebene bestätigt. Dieser Ansatz erlaubt jedoch nur die Identifizierung von Varianten, die aufgrund von Aminosäureaustauschen entstehen, welche die elektrische Ladung, das Molekulargewicht oder den isoelektrischen Punkt des Proteins ändern. Um jedoch alle vorhandenen Varianten identifizieren zu können, wurde die Methode der direkten Resequenzierung der milchproteinkodierenden Gene gewählt.

Eine der Hauptaufgabe in beiden Arbeitspaketen war es daher, zunächst eine ausreichende Anzahl an DNA-Proben zu akquirieren und anschließend den offenen Leserahmen sowie angrenzende intronische Sequenzabschnitte der milchproteinkodierenden Gene zu sequenzieren. Zur Analyse der Rinder- und einiger Schafrassen waren Blut- und Spermaproben aus früheren Arbeiten vorhanden oder wurden von unseren Projektpartnern von den Universitäten Bern, Göttingen und Kassel zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchung der Pferderassen und einiger Schafrassen mussten zunächst deutschlandweit Proben in Form von Blut, Mähnenhaaren oder Wolle gesammelt werden. Auf diese Weise konnten die milchproteinkodierenden Gene von 450 Rindern aus 18 Rassen, 170 Schafen aus 8 Rassen und 250 Pferden aus 14 Rassen vergleichend sequenziert werden. Somit wurden insgesamt im Teilprojekt 3.1 fast 40.000 PCR Produkte erstellt und anschließend mit dem ABI 3130xl Genetic Analyzer vergleichend sequenziert.

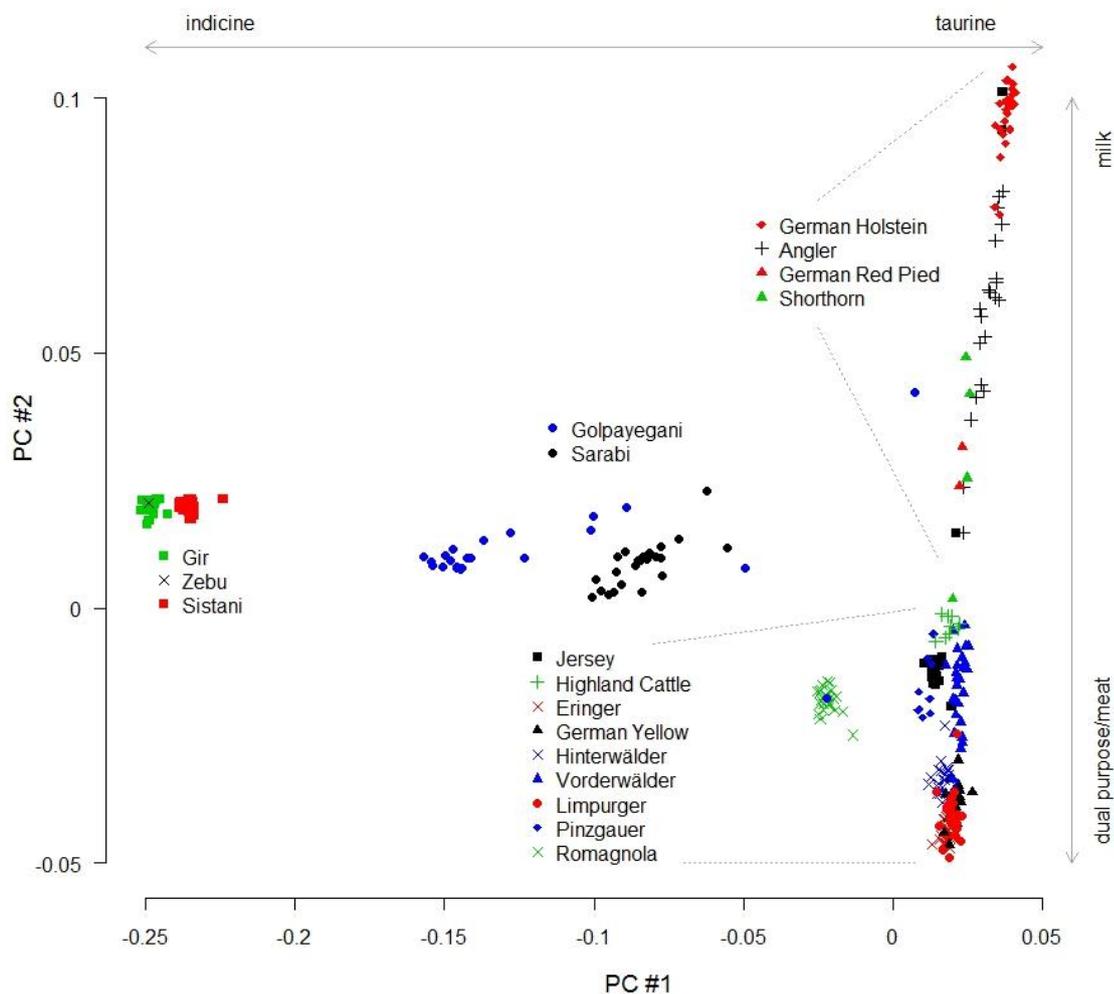
Auf diese Weise konnten beim Rind 24 bereits bekannte Varianten auf DNA-Ebene bestätigt werden, aber auch sechs bisher unbekannte Varianten identifiziert werden. Beim Schaf wurden neben 18 bereits bekannten Varianten drei neue Varianten ermittelt. Beim Pferd konnten sogar 44 verschiedene Varianten identifiziert werden, von denen 35 bisher nicht bekannt waren.

Mit den so erzeugten Daten wurden unter anderem Allelfrequenzen aller untersuchten Rassen berechnet.

#### *Populationsstruktur und Introgressionsszenarien*

Während der Evolution des Menschen haben Rinder bereits seit langer Zeit eine wichtige Rolle gespielt. Die Domestikation des Rindes, aber auch des Schafes und der Ziege, fand bereits im achten Jahrhundert v. Chr. im Nahen Osten statt. Kürzlich konnten Evershed et al. (2008) zeigen, dass nicht nur Fleisch sondern auch Milch bereits im siebten Jahrhundert v. Chr. im Nahen Osten und in Südost Europa genutzt wurde. Der allgemeine Konsens, dass die modernen Rinderrassen zweier unabhängiger Domestikationsereignissen des wilden Auerochsen (*Bos primigenius*) vor etwa 10.000 Jahren entstammen wird immer wieder kontrovers diskutiert. Trotzdem geht man davon aus, dass aus den beiden Hauptdomestikati-

onszentren im Mittleren Osten/Europa und auf dem indischen Subkontinent die taurinen und indicinen Linien (*Bos taurus* und *Bos indicus*) hervorgegangen sind (McTavish *et al.* 2013). Die genetischen Varianten der Milchproteingene sind sehr hilfreich bei der Analyse der genetische Verwandtschaft der *Bos* Spezies, da einige Allele vorwiegend oder sogar ausschließlich bei *Bos indicus* Rassen vorkommen während sie in den *Bos taurus* Rassen nur selten oder überhaupt nicht vorhanden sind. Im Arbeitspaket 1 konnten bei den Kaseinkodierenden Genen des Rindes fünf neue Varianten identifiziert werden, allerdings nur bei indicinen Rassen sowie bei einer lokalen iranischen Rasse, die phänotypisch als *Bos taurus* klassifiziert wurde. Mittels eines Multidimensionalen Skalierungsansatzes (MDS) basierend auf bereits vorhandenen SNP-Chip Daten konnte eine Vermischung tauriner und indiciner Populationen in dieser Rasse sowie in einer weiteren lokalen iranischen Rasse aufgezeigt werden (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Graphische Darstellung der MDS Analyse. Die ersten beiden Dimensionen wurden gegeneinander geplottet. Die erste Dimension unterteilt die taurinen und indicinen Rassen.

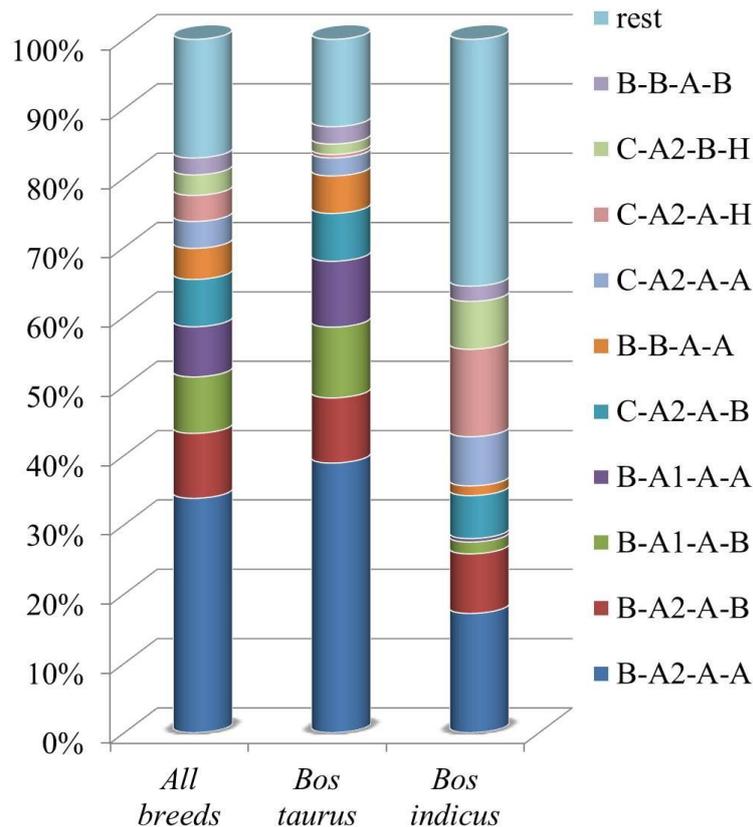
Weiterhin wurden bereits bekannte typische indicine Allele in einigen der untersuchten europäischen taurinen Rassen identifiziert. Dies deutet auf eine Introgression indiciner Rassen in diese Populationen hin und wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Jann *et al.* 2004; Caroli *et al.* 2009)

Mit diesen Ergebnissen konnte die Existenz erheblicher unentdeckter genetischer Variabilität der bovinen Kasein-Loci, insbesondere in indicinen Rassen aufgezeigt werden. Die Identifi-

zierung neuer Varianten ist ein wertvolles Hilfsmittel für weitere phylogenetische Studien sowie für Untersuchungen zur Evolution der Milchproteingene.

### *Haplotypanalysen*

Bei der Vererbung der Kaseinvarianten ist eine Besonderheit zu beachten. Die vier Kaseinkodierenden Gene liegen sehr eng in einem 250 kb großen Cluster auf dem bovinen Autosom 6 (BTA6) beieinander (Ferretti *et al.* 1990; Threadgill & Womack 1990). Das bedeutet, dass die Varianten dieser vier Gene nicht unabhängig voneinander sondern als Haplotypen vererbt werden. Dieses ist insbesondere dann von Interesse, wenn der Einfluss spezifischer Kaseinvarianten auf beispielsweise die Zusammensetzung der Milch oder Käseereigenschaften untersucht werden soll. Auch im Hinblick auf die Eignung der verschiedenen Milchproteinvarianten als Hilfsmittel für phylogenetische Studien, sollten nicht nur die Varianten einzelner Gene, sondern auch Kaseinhaplotypen Berücksichtigung finden (Beja-Pereira *et al.* 2002; Jann *et al.* 2004; Caroli *et al.* 2009). Aus diesem Grund wurden zusätzlich die Frequenzen und Verteilungen der Kaseinhaplotypen tauriner und indiciner Rassen analysiert. Für die Schätzung der Haplotypfrequenzen wurde die Software PHASE 2.1 (Stephens *et al.* 2001; Stephens & Scheet 2005), ein Haplotypen-Rekonstruktionsalgorithmus, angewendet. Alle Tiere und alle identifizierten nicht-synonymen Nukleotidaustausche der vier Kaseingene wurden in die Untersuchung miteinbezogen und die taurinen und indicinen Rinder wurden mittels einer Case-Control Permutationstests in zwei Gruppen unterteilt. Aufgrund der limitierten Tierzahl wurden bei der Auswertung der Ergebnisse nur Haplotypen weiter berücksichtigt, die mit einer Häufigkeit von über einem Prozent in mindestens einer Gruppe auftraten. Obwohl die geschätzten Haplotypfrequenzen mit Vorsicht interpretiert werden sollten, bieten sie doch einen guten Überblick über die allgemeine Verteilung der Haplotypen innerhalb der untersuchten Rassen. Abbildung 2 zeigt die Frequenzen der zehn häufigsten Haplotypen aller Rassen und ihre Verteilung innerhalb der taurinen und indicinen Rassen. Die Haplotypen sind dabei gemäß ihrer Reihenfolge und Position auf dem Chromosom *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* und *CSN3* ( $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -,  $\alpha_{S2}$ - und  $\kappa$ -Kaseinkodierendes Gen) dargestellt und wurden vorher aus den Genotypen abgeleitet.



**Abbildung 2:** Prozentualer Anteil der zehn häufigsten Kaseinhaplotypen (*CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* und *CSN3*) innerhalb aller Rassen und ihr Anteil in den taurinen und indicinen Rassen.

#### *Eine neue Lactalbuminvariante*

Bei der Untersuchung der Molkeprotein-kodierenden Gene des Rindes konnten beim  $\beta$ -Lactoglobulin vier bereits bekannte Varianten ermittelt werden. Beim  $\alpha$ -Lactalbumin konnten zwei bekannte Varianten und sogar eine unbekannt Variante detektiert werden. Die Identifizierung einer neuen Variante des  $\alpha$ -Lactalbumins ist insofern eine besondere Entdeckung als dass dieses Protein eine wichtige Rolle bei der normalen Lactosesynthese spielt. Dies konnte an Mäusen gezeigt werden, die keine funktionierende Kopie des  $\alpha$ -Lactalbumin kodierenden Gens besaßen. Diese Tiere produzierten nur geringe Mengen einer eingedickten Milch, die keine Lactose enthielt und waren nicht in der Lage ihre Würfe aufzuziehen (Stacey *et al.* 1995). Aus diesem Grund würde man einen hohen Grad der Konservierung bei diesem Gen bzw. Protein erwarten, was durch die bisher nur kleine Zahl von zwei auf DNA-Level identifizierten Varianten wiedergespiegelt wird. Weiterhin ist es unwahrscheinlich, dass ein Polimorphismus, der die fundamentale Rolle des  $\alpha$ -Lactalbumins stark beeinträchtigt überhaupt in Populationen segregiert. Die Analyse der Proteinsequenz unserer neu identifizierten Variante mittels der Software ProPhyLER (Binkley *et al.* 2010) zeigte, dass der resultierende Aminosäureaustausch höchstwahrscheinlich keinen Effekt auf die Funktion des Proteins beim Rind haben wird, da die neue Aminosäure (Valin anstatt Isoleucin an Position 60 des Proteins) die übliche Aminosäure bei Mäusen ist. Außerdem ist auch keine funktionelle Einheit des Proteins durch den Aminosäureaustausch betroffen, wie etwa die Kalziumbindungsstelle oder die Glykosylierungsstelle.

### Bildung bioaktiver Peptide

Der mögliche Einfluss der Milchproteinvarianten resultierend aus Aminosäureaustauschen oder –deletionen wurde anhand des  $\beta$ -Kaseins exemplarisch untersucht. Die Aminosäuresequenz des Proteins inklusive Signalpeptid (graue Buchstaben) ist in Abbildung 3 dargestellt. Gelb unterlegte Buchstaben zeigen die Positionen bereits bekannter Aminosäureaustausche und grün die der in dieser Studie neu identifizierten. Bioaktive Peptide, die aufgrund eines Abbaus während der in vitro oder in vivo Verdauung des  $\beta$ -Kaseins entstehen, werden durch die blau gestrichelten Linien dargestellt und näher in Tabelle 1 beschrieben. Die rot gestrichelte Linie markiert ein von unseren Projektpartnern (Arbeitsgruppe Prof. Meisel) neu identifiziertes bioaktives Peptid. Interessanterweise konnten wir genau innerhalb der Sequenz dieses neuen Peptids einen Aminosäureaustausch von Valin zu Alanin an Position 197 des Proteins finden. Mit dem heutigen Kenntnisstand ist es allerdings nicht möglich vorherzusagen, wie dieser Aminosäureaustausch die Bioaktivität des Peptids verändern würde.

**Tabelle 1:** Beispiele multifunktionaler bioaktiver Peptide aus dem bovinen  $\beta$ -Kasein. modifiziert nach (Meisel 1997; Meisel & Bockelmann 1999; Fitzgerald & Meisel 2003; Silva & Malcata 2005)

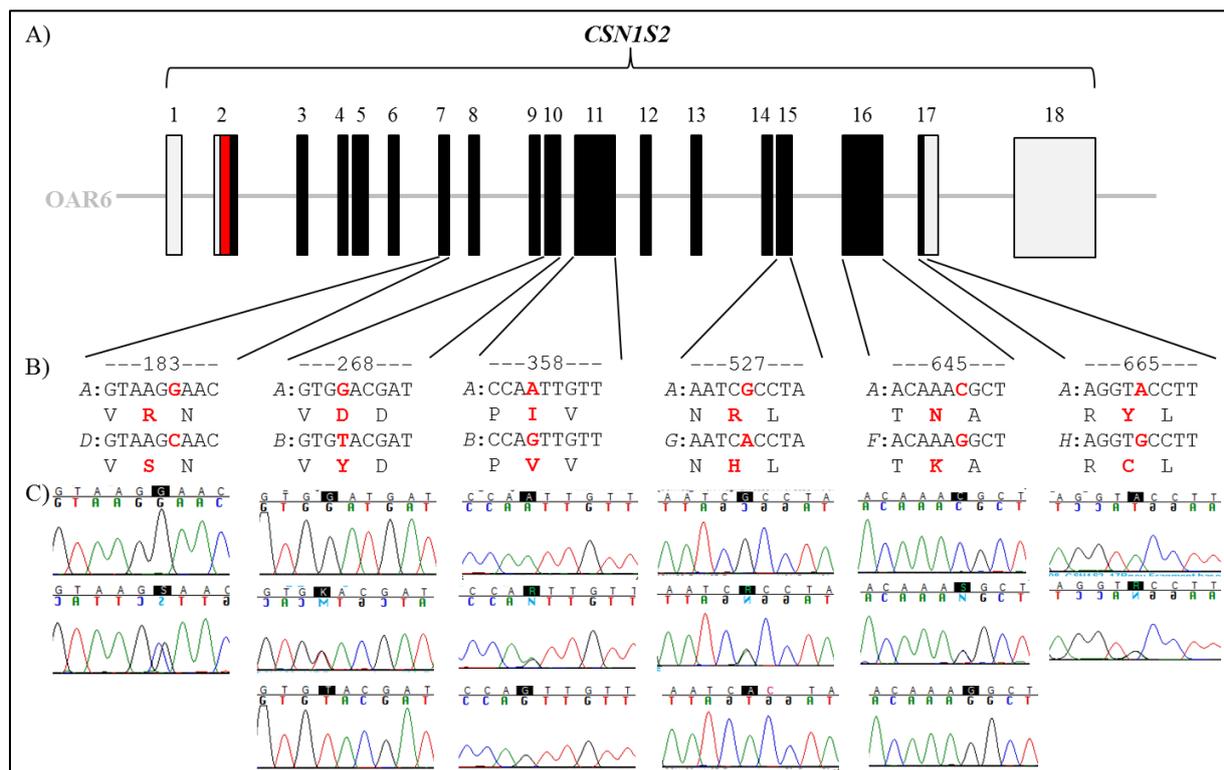
Peptide Sequence	Frag- ment	Name	Biological Activity				Reference
			ACE- inhibito- ry	opio- id	immuno- modulato- ry	Ca <sup>2+</sup> - bin- ding	
RELEELN...INK	f(1-25)	Caseino- phosphopepti- de			+	+	Schlimme & Meisel (1995)
SLVLPVPE	f(57-64)		+				Yamamoto et al. (1994)
YPFPGPIP	f(60-66)	$\beta$ -Casomor- phin-7	+	+			Meisel & Schlimme. (1994)
PGPIP	f(63-68)	Immunopepti- de			+		Parker et al., (1984)
IPP	f(74-76)	$\beta$ -Casokinin	+				Nakamura et al. (1995)
VPP	f(84-86)	$\beta$ -Casokinin	+				Nakamura et al. (1995)
EMPFPK	f(108- 113)		+				Philanto- Leppälä et al. (1998)
KVLPVP	f(169- 174)		+				Maeno et al. (1996)
AVPYPQR	f(177- 183)	$\beta$ -Casokinin-7	+				Maruyama et al. (1987)
YQQPVL	f(193- 198)		+				Philanto- Leppälä et al. (1998)
YQQPVLGPVR	f(193- 202)	$\beta$ -Casokinin-10	+				Meisel & Schlimme. (1994)
DMPIQAFLLYQ...PV R	f(184- 202)						Meisel, perso- nal communi- cation



aufweist und in manchen Studien als ein Risikofaktor für ischämische Herzerkrankungen und den plötzlichen Kindstod gehandelt wurde. Obwohl bisher keine kausale Beziehung zwischen der oralen Aufnahme des  $\beta$ -Casomorphin-7 und der Ätiologie der genannten Krankheiten belegt werden konnte, wir seit mehreren Jahren sowohl in Australien als auch in Neuseeland eine sogenannte, als besonders bekömmlich beworbene A2-Milch vertrieben, bei der kein  $\beta$ -Casomorphin-7 während der Verdauung entstehen kann.

#### Ovine Varianten

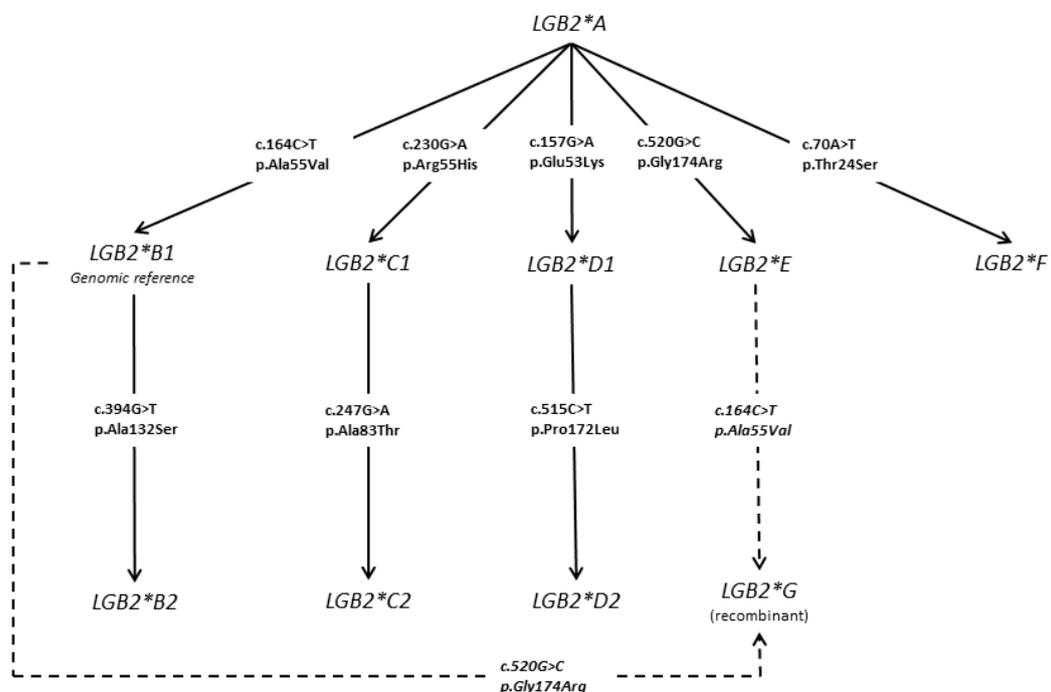
Auch beim Schaf wurden bisher schon einige Milchproteinvarianten auf Proteinlevel beschrieben (Ceriotti *et al.* 2004; Chessa *et al.* 2010; Giambra *et al.* 2010b; Giambra *et al.* 2010a; Giambra & Erhardt 2011). Das Wissen über den genetischen Hintergrund dieser Varianten ist dabei jedoch noch lückenhaft. Innerhalb dieser Studie wurden deshalb die sechs Milchproteinkodierenden Gene *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2*, *CSN3*, *LAA* und *LGB* bei 170 Schafen acht schweizer und französischer Schafassen vergleichend sequenziert. Mit diesem Ansatz konnten eine neue Variante des  $\alpha_{S2}$ -Kasein kodierenden Gens *CSN1S2* (Abbildung 4), sowie zwei neue Varianten des  $\alpha$ -Lactalbumin kodierenden Gens *LAA* identifiziert werden. Außerdem wurden 18 der 28 bereits bekannte Varianten auf genetischer Ebene wiederentdeckt.



**Abbildung 4:** Bekannte und neu identifizierte Polymorphismen, die die Varianten des  $\alpha_{S2}$ -Kasein kodierenden Gens *CSN1S2* bestimmen. A) Struktur des *CSN1S2*; weiße Balken = Exons, die nicht zum offenen Leserahmen gehören; rote Balken = Teil des 2. Exons, welcher das Signalpeptid kodiert; schwarze Balken = Exons, die zum offenen Leserahmen des Gens gehören. B) Ausschnitte der Nukleotidsequenzen und daraus resultierende Aminosäuresequenzen, die die Einzelbasenaustausche und zugehörige Aminosäureaustausche beinhalten. C) Entsprechende Elektropherogramme.



Menschen und einiger anderer Tierarten überhaupt kein  $\beta$ -Lactoglobulin und gilt deshalb bei der Ernährung des Menschen mit Milch als ein Hauptverursacher der Milchproteinallergie. Trotzdem wird Stutenmilch von den meisten Betroffenen besser vertragen. Bei der vergleichenden Sequenzierung der  $\beta$ -Lactoglobulin kodierenden Gene *LGB1* und *LGB2* konnten nur eine Signalpeptidvariante des *LGB1*, aber zehn verschiedene Varianten des *LGB2* identifiziert werden. *LGB1* kommt also deutlich konservierter in den untersuchten Rassen vor. Dies deutet auf einen höheren Selektionsdruck des Gens hin und legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um das ancestrale Gen handelt, dessen wichtige Funktion erhalten werden muss. Aufgrund des geringen Probenumfangs ist eine Aussage bezüglich der Evolution der neu identifizierten Varianten des *LGB2* schwierig, insbesondere für nur selten vorkommende Varianten. Anhand der verfügbaren Informationen wurde trotzdem ein Modell für die Evolution der Varianten entwickelt, welches in Abbildung 6 dargestellt ist.



**Abbildung 6:** Wahrscheinliche Evolution der equinen *LGB2*-Varianten.

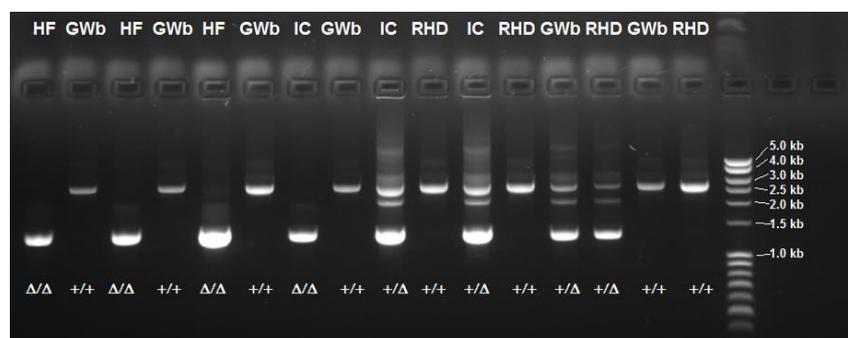
Des Weiteren wurden die offenen Leserahmen der vier Kasein kodierenden Gene bei 253 Pferden 14 verschiedener Rassen vergleichend sequenziert. Auf diese Weise konnten 21 nicht synonyme Basenaustausche, sowie 11 synonyme Basenaustausche identifiziert werden. Diese Basenaustausche führen zu 31 möglichen Proteinisoformen, von denen 26 bisher völlig unbekannt waren. Für alle Rassen wurden Allelfrequenzen berechnet, die zwar aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Tier pro Rasse mit Vorsicht betrachtet werden müssen, dennoch ein guten allgemeinen Überblick über die Verteilung der Varianten über die verschiedenen Rassen liefern. Den höchsten Grad an genetischer Variabilität bezogen auf die Kaseinvarianten zeigte das Islandpony mit 19 verschiedenen Varianten. Vier dieser Varianten wurden ausschließlich bei dieser Rasse gefunden. Dieses Ergebnis scheint auf den

ersten Blick unerwartet, da diese Rasse ursprünglich aus einer kleinen Gründungspopulation hervorgegangen ist. Die Tiere der Gründerpopulation wurden vor etwa 1100 Jahren nach Island gebracht und in einer geschlossenen Population von dann auf Island weiter gezüchtet. Allerdings wurden die Proben unser analysierten Islandponys nicht direkt in Island gesammelt. Hreidarsdóttir *et al.* (2014) berichten von einer höheren genetischen Diversität aufgrund effektiver Gründertiere außerhalb Islands als innerhalb der isländischen Population.

Stutenmilch wird häufig als hypoallergenes Lebensmittel betrachtet. Es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass Stutenmilch von 96 % der, an einer Kuhmilchallergie (CMA) leidenden Kinder toleriert wird (Businco *et al.* 2000; Curadi *et al.* 2001). CMA ist eine IgE vermittelte allergische Reaktion, die eine Vielzahl an Symptomen auslöst, wie beispielsweise atopische Dermatitis, Obstipation oder frühkindliche Koliken. Etwa 2% aller Kinder die mit Milchaustauscher auf Kuhmilchbasis ernährt werden leiden an einer CMA. Von den Kaseinen konnte das  $\alpha_{S1}$ -Kasein als das Protein mit dem höchsten allergenen Potenzial ermittelt werden. Viele von CMA Betroffene zeigen einen erhöhten Titer an IgE spezifisch für dieses Protein (Shek *et al.* 2005; Ruiter *et al.* 2006; Gaudin *et al.* 2008; Schulmeister *et al.* 2009; Lisson *et al.* 2013). Als Gründe für die geringe Allergenität der Stutenmilch werden beispielsweise die Abwesenheit relevanter Epitope für die IgE Bindung diskutiert. In dieser Studie konnte eine Signalpeptidvariante des Allels *CSN1S1\*B* identifiziert werden, die möglicherweise eine Reduktion des Gehalts an  $\alpha_{S1}$ -Kasein zur Folge haben kann. Diese Variante kam relativ häufig mit einer Frequenz von 0,5 vor. Leider war es nicht möglich weitere Untersuchungen zum Einfluss dieser Variante auf die  $\alpha_{S1}$ -Kasein-Menge in Stutenmilch zu machen. Dieses sollte aber dringend in folgen Studien getan werden.

#### *Beschreibung und Validierung einer strukturellen Caseinvariante beim Pferd*

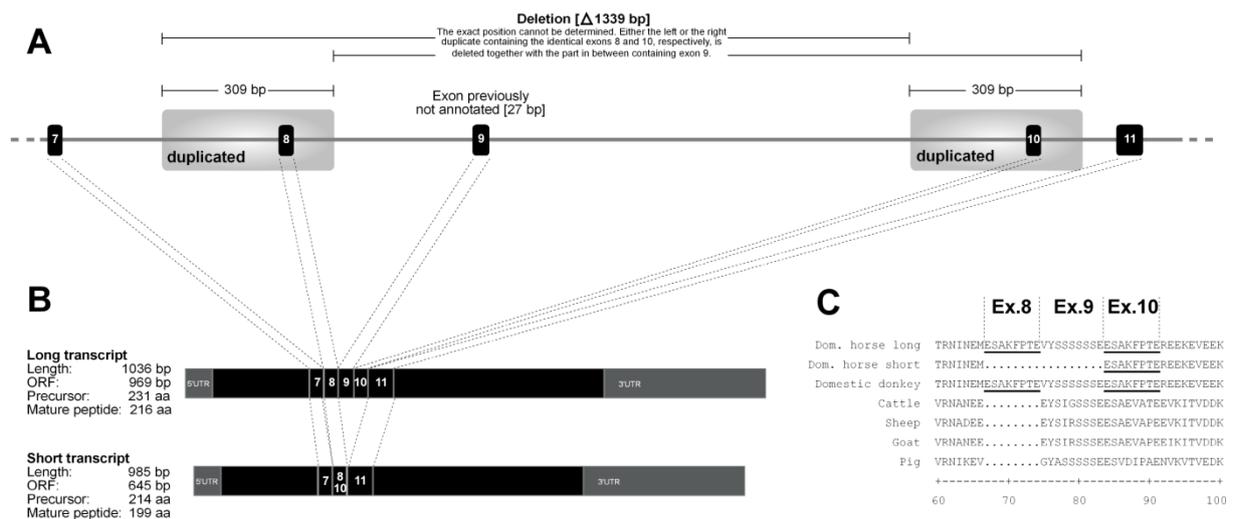
Während der Untersuchung der Kasein kodierenden Gene wurde eine Besonderheit beim equinen  $\alpha_{S2}$ -Kasein festgestellt, die im Folgenden näher erläutert werden soll. Die aktuelle Annotation des equinen  $\alpha_{S2}$ -Kasein kodierenden Gens *CSN1S2* (Gene ID 100327035) basiert auf der mRNA-Referenzsequenz NM\_001170767.2, die aus 15 kodierenden Exons besteht und einen offenen Leserahmen von 645 bp ausmacht. Während der Resequenzierung des offenen Leserahmens dieses Gens fiel auf, dass bei bestimmten Pferden die PCR-Reaktion für Exon 8 und 9 konsistent und wiederholt misslangen. Um die mögliche Ursache für dieses Phänomen zu finden, wurde ein 2,6 kb großes Fragment, das die gesamte Region umspannt amplifiziert. Während das erwartete Produkt in den Proben, die zuvor erfolgreich amplifiziert wurden, enthalten war, war das Produkt der zuvor misslungenen Proben etwa 1,3 kb kürzer (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Agarosegelelektrophorese der PCR Produkte im Bereich der 1,3kb großen Deletion. Die obere Bande stellt die lange Variante dar (+), die unter die kurze Variante mit der Deletion ( $\Delta$ ). Bei heterozygoten Tieren wird eine dritte Bande sichtbar, die vermutlich auf

asymmetrischer Hybridisierung beruht. Die Rassen der Tiere sind oberhalb des Geles angegeben (HF = Haflinger, GW= Dt. Warmblut, IC = Isländer, RHD = Russisches Lastpferd)

Eine anschließende Sanger Sequenzierung des kürzeren Produkts zeigte eine 1,339 bp große Deletion (Abbildung 8A). Das große Produkt zeigte hingegen ein komplette Übereinstimmung mit der genomischen Referenzsequenz (NC\_009146.2). Die Untersuchung dieser Sequenz zeigte das Vorhandensein einer 309 bp großen Duplikation der Exon 8 umgebenden Region. Da diese Duplikation exakt an der Grenze der Deletion lokalisiert ist, kann die genaue Position nicht genau bestimmt werden. Das heißt, es kann nicht gesagt werden, ob die aufwärts oder abwärts gelegene Duplikation in die Deletion involviert ist.



**Abbildung 8 Struktur der strukturellen Caseinvariante beim Pferd.**

Die Deletion konnte in alle untersuchten Rassen nachgewiesen werden, wobei die höchsten Frequenzen von 0.36 und 0.25 beim Haflinger und Islandpony beobachtet wurden. Bemerkenswert hieran ist, dass insbesondere der Haflinger häufig zur Stutenmilchproduktion genutzt wird. Dies könnte auf einen Effekt der Mutation oder eines bestimmten Kasein-Haplotypen auf die Milchleistung hindeuten, wie es beim Rind bereits bekannt ist (McLean *et al.* 1984; Ikonen *et al.* 2001).

Eine RNA Analyse der entrahmten Milch vierer Stuten, von denen drei homozygot für das lange und eine homozygot für das kurze Produkt waren. Die Gelelektrophorese der PCR Produkte zeigte einen Unterschied von etwa 50 bp zwischen den alternativ homozygoten Tieren. Dies beweist, dass sowohl das lange als auch das kurze Transkript exprimiert wurden.

Translationen des langen und kurzen Transkripts wurden mit verfügbaren Proteinsequenzen des Hausesels (Acc. No. CAV00691.1, des Rindes (Acc. No. NP776953.1), des Schafs (Acc. No. NP\_001009363.1), der Ziege (Acc. No. NP\_001272514.1) und des Schweins (Acc. No. NP\_001004030.1) abgeglichen. Der Abbildung 8C kann man entnehmen, dass die Duplikation von Exon 8/10 einzigartig für den Esel und das Pferd ist, während das equine Exon 9 homologe Sequenzen zu anderen Paarhufern zeigt.

Weiterhin wurde gefriergetrocknetes Milchpulver zweier Stuten homozygot für die kurze bzw. die lange Variante mittels SDS-Page-Analyse untersucht. Hierbei wurden einzigartige Peptide nur für die lange Version bei dem Tier gefunden, dass homozygot für die Insertion war. Diese Peptide waren sowohl in phosphorylierter als auch in unphosphorylierter Form vor-

handen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die lange und die kurze Variante sich auf Proteinebene in einer Länge von 17 Aminosäuren unterscheiden. Die vergleichende Analyse zwischen den Tierarten zeigte, dass die lange Variante wahrscheinlich die ancestrale Form darstellt. Allerdings scheint es die Variante schon vor der Abspaltung der Esel und Zebras vom Pferd gegeben zu haben. Somit wird vorgeschlagen, die lange Variante mit *CSN1S2\*A* und die kurze mit *CSN1S2\*B* zu bezeichnen.

#### *Entwicklung von Testverfahren und züchterische Strategien*

Im Rahmen eines Laborpraktikums wurde ein Projekt zur Evaluation PCR-basierter Testverfahren zum qualitativen / quantitativen Nachweis bestimmter Varianten durchgeführt. Dazu wurde exemplarisch das bovine  $\beta$ -Casein betrachtet, weil dies praktische Relevanz hat. Bereits heute ist Milch auf dem Markt, welche spezifisch die Variante A2 enthält. Es wurde eine allelspezifische PCR mit 3 Primerpaaren durchgeführt, welche auf DNA Ebene die Allele identifiziert, welche die entsprechenden Proteinvarianten determinieren. Es zeigte sich, dass eine Variantendiskrimination möglich ist. Daher ist ein praktischer Einsatz unter Übertragung dieser Ergebnisse auf einen quantitativen RealTime-Ansatz leicht möglich. Allerdings spielt dies derzeit am deutschen Markt noch keine bedeutende Rolle.

Es wurde ein hohes Maß an Variation beim Rind gefunden, allerdings traten neue Varianten vornehmlich in indicinen Rassen auf, was eine Introgression in hochleistende Milchrassen schwer macht. Vor dem Hintergrund aktueller Entwicklungen auf dem Gebiet des Genome editings ist es jedoch fraglich, inwieweit, dies überhaupt relevant sein wird.

#### **Literatur**

Auflistung der zitierten Drittliteratur; eigene Publikationen s. unter 2.6.

- Beja-Pereira, A.; Erhardt, G.; Matos, C.; Gama, L.; Ferrand, N. (2002): Evidence for a geographical cline of casein haplotypes in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetics* **33**: 295–300.
- Binkley, J.; Karra, K.; Kirby, A.; Hosobuchi, M.; Stone, E. A.; Sidow, A. (2010): ProPhyLER. *Genome Research* **20**: 142–154.
- Businco, L.; Giampietro, P. Gianni; Lucenti, P.; Lucaroni, F.; Pini, C.; Di Felice, G.; Iacovacci, P.; Curadi, C.; Orlandi, M. (2000): Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105**: 1031–1034.
- Caroli, A. M.; Chessa, S.; Erhardt, G. J. (2009): Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of dairy science* **92**: 5335–5352.
- Ceriotti, G.; Marletta, D.; Carol, A.; Erhardt, G. (2004): Milk protein loci polymorphism in taurine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) populations bred in hot climate. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **121**: 404–415.
- Chessa, S.; Rignanese, D.; Berbenni, M.; Ceriotti, G.; Martini, M.; Pagnacco, G.; Caroli, A. (2010): New genetic polymorphisms within ovine  $\beta$ - and  $\alpha_{S2}$ -caseins. *Small Ruminant Research* **88**: 84–88.
- Curadi, M. C.; Giampietro, P. G.; Lucenti, Patrizia; Orlandi, Mario (Eds.) (2001): Use of mare milk in pediatric allergology. Associazione Scientifica di Produzione Animale XIV Congress. Firenze, 12.-15.06.2001.
- Evershed, R. P.; Payne, S.; Sherratt, A. G.; Copley, M. S.; Coolidge, J.; Urem-Kotsu, D.; Kotsakis, K.; Ozdoğan, M.; Ozdoğan, A. E.; Nieuwenhuys, O. et al. (2008): Earliest date

- for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature* **455**: 528–531.
- Ferretti, L.; Leone, P.; Sgaramella, V. (1990): Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Research* **18**: 6829–6833.
- Fitzgerald, R. J.; Meisel, H. (2003): Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (Eds.): *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins. Part A / Part B*. 3rd Edition. Boston, MA, s.l.: Springer US: 675–698.
- Gaudin, J.-C.; Rabesona, H.; Choiset, Y.; Yeretssian, G.; Chobert, J.-M.; Sakanyan, V.; Drouet, M.; Haertlé, T. (2008): Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to milk-specific proteins in allergic patients using microarrays. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **38**: 686–693.
- Giambra, I. J.; Erhardt, G. (2011): Molecular genetic characterization of ovine CSN1S2 variants C and D reveal further important variability within CSN1S2. *Animal Genetics* **43**: 642–645.
- Giambra, I. J.; Jäger, S.; Erhardt, G. (2010a): Isoelectric focusing reveals additional casein variants in German sheep breeds. *Small Ruminant Research* **90**: 11–17.
- Giambra, I. Jasmin; Chianese, L.; Ferranti, P.; Erhardt, G. (2010b): Genomics and proteomics of deleted ovine CSN1S1\*1. *International Dairy Journal* **20**: 195–202.
- Hreidarsdóttir, G.; Árnason, T.; Svansson, V.; Hallson, J. (2014): Analysis of the history and population structure of the Icelandic horse using pedigree data and DNA analyses. *Icelandic Agricultural Sciences*: 63–79.
- Ikonen, T.; Bovenhuis, H.; Ojala, M.; Ruottinen, O.; Georges, M. (2001): Associations Between Casein Haplotypes and First Lactation Milk Production Traits in Finnish Ayrshire Cows. *Journal of Dairy Science* **84**: 507–514.
- Jann, O. C.; Ibeagha-Awemu, E. M.; Ozbeyaz, C.; Zaragoza, P.; Williams, J. L.; Ajmone-Marsan, P.; Lenstra, J. A.; Moazami-Goudarzi, K.; Erhardt, G. (2004): Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. *Genetics Selection Evolution* **36**: 243–257.
- Lisson, M.; Lochnit, G.; Erhardt, G. (2013): Genetic variants of bovine  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein result in different immunoglobulin E-binding epitopes after in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science* **96**: 5532–5543.
- McLean, D. M.; Graham, E. R. Bruce; Ponzoni, R. W.; McKenzie, H. A. (1984): Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *Journal of Dairy Research* **51**: 531.
- McTavish, E. Jane; Decker, J. E.; Schnabel, R. D.; Taylor, J. F.; Hillis, D. M. (2013): New World cattle show ancestry from multiple independent domestication events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: E1398-406.
- Meisel, H. (1997): Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* **43**: 119–128.
- Meisel, H.; Bockelmann, W. (1999): Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. In W. N. Konings, O. P. Kuipers, Veld, J. H. J. Huis (Eds.): *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 19-23 September 1999, Veldhoven, the Netherlands*. Dordrecht: Springer Netherlands: 207–215.
- Ruiter, B.; Trégoat, V.; M'rabet, L.; Garssen, J.; Bruijnzeel-Koomen, C A F M; Knol, E. F.; Hoffen, E. (2006): Characterization of T cell epitopes in alphas1-casein in cow's milk al-

- lergic, atopic and non-atopic children. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **36**: 303–310.
- Schulmeister, U.; Hochwallner, H.; Swoboda, I.; Focke-Tejkl, M.; Geller, B.; Nystrand, M.; Harlin, A.; Thalhamer, J.; Scheibhofer, S.; Keller, W. et al. (2009): Cloning, Expression, and Mapping of Allergenic Determinants of S1-Casein, a Major Cow's Milk Allergen. *The Journal of Immunology* **182**: 7019–7029.
- Shek, L. P. C.; Bardina, L.; Castro, R.; Sampson, H. A.; Beyer, K. (2005): Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy* **60**: 912–919.
- Silva, S. V.; Malcata, F. X. (2005): Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* **15**: 1–15.
- Stacey, A.; Schnieke, A.; Kerr, M.; Scott, A.; McKee, C.; Cottingham, I.; Binas, B.; Wilde, C.; Colman, A. (1995): Lactation is disrupted by alpha-lactalbumin deficiency and can be restored by human alpha-lactalbumin gene replacement in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 2835–2839.
- Stephens, M.; Scheet, P. (2005): Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *American journal of human genetics* **76**: 449–462.
- Stephens, M.; Smith, N. J.; Donnelly, P. (2001): A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American journal of human genetics* **68**: 978–989.
- Threadgill, D. W.; Womack, J. E. (1990): Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Research* **18**: 6935–6942.
- Visker, M.; Dibbits, B. W.; Kinders, S. M.; van Valenberg, H. J. F.; Van Arendonk, J. A. M.; Bovenhuis, H.: Association of bovine  $\beta$ -casein protein variant I with milk production and milk protein composition. *Animal Genetics* **42**: 212–218.
- Yamamoto, N.; Takano, T. (1999): Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung-Food* **43**: 159–164.

## 2.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigste Position des zahlenmäßigen Nachweises waren die Personalkosten. Die bewilligten Stellen (2 x wissenschaftliche Mitarbeiterin 0,5 E13) wurden von Frau Julia Tetens geb. Gallinat sowie Frau Julia Brinkmann im Rahmen ihrer Promotion besetzt. Zusätzlich wurde Herr Claas Heuer während der Elternzeit von Frau Brinkmann für die Datenauswertung angestellt. Was die Sachmittel angeht, so haben die Verbrauchsmaterialien in Zusammenhang mit der Sanger-Sequenzierung (von der Probennahme und DNA-Aufbereitung bis zur fertigen Sequenz) den größten Anteil ausgemacht.

## 2.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit war notwendig und angemessen, um die Ziele des Projektes zu erreichen. Die zeitaufwändigsten Arbeitsschritte in beiden Projektabschnitten waren die Amplifikation und Sequenzierung der Zielgene sowie die anschließende Auswertung der Sequenzdaten. Dieses Vorgehen ist jedoch angemessen, weil auf diese Weise auch Genvarianten identifiziert werden können, die keine mit herkömmlichen Methoden messbare Änderung der Proteineigenschaften hervorruft. Gleichzeitig sind auch synonyme Mutationen identifizierbar, was wertvolle Informationen im Hinblick auf die Variatenevolution und populationsgenetische Betrachtungen liefert. Insofern sind die Arbeiten als grundlegend zu betrachten, der konkrete Bezug zur Funktionalität von Varianten liefert aber gleichzeitig praktisch umsetzbare Ergebnisse.

## **2.4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

### *Wirtschaftliche Erfolgsaussichten*

Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten sind zum jetzigen Zeitpunkt schwer einzuschätzen. Mit der sog. A2-Milch gibt es bereits variantenspezifische Produkte am Markt und es dürfte davon auszugehen sein, dass weitere derartige Produkte ihren Weg zum Verbraucher finden werden. Das vorliegende Projekt hat dazu wesentliche Voraussetzungen geschaffen.

### *Technische und wissenschaftliche Erfolgsaussichten*

Die wissenschaftlichen und technischen Erfolgsaussichten sind aktuell nach Projektende als gut einzuschätzen. Die technische Übertragbarkeit in bestehende Verfahren ist gegeben.

### *Anschlussfähigkeit*

Die im Teilprojekt gewonnenen Ergebnisse liefern wichtige Grundlagen für eine weitergehende funktionelle Charakterisierung verschiedener Varianten. Insbesondere in der Zusammenschau mit den am Max-Rubner-Institut erzielten Ergebnissen zur Biofunktionalität ist die Anschlussfähigkeit als gut zu bezeichnen.

## **2.5. Während der Durchführung bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

In 2012 wurde von einer niederländischen Arbeitsgruppe eine neue bovine Lactalbuminvariante charakterisiert (Visker *et al.* 2012, *s.o.*). Dies hat die Arbeiten im Projekt nicht tangiert.

## **2.6. Erfolgte und geplante Veröffentlichung**

### *Habilitation*

Einige Publikationen aus dem Projekt sind Bestandteil der Habilitationsschrift von Jens Tetens: Recent advances in cattle genomics and beyond, A&E-Fakultät der CAU 2015.

### *Dissertationen*

Julia Tetens, geb. Gallinat (2014): Genetic Variability of Bovine and Ovine Milk Protein Genes. Schriftenreihe des Institutes für Tierzucht und Tierhaltung der CAU Kiel, Nr. 208, ISSN 0720-4272.

Julia Brinkmann, geb. Schwarz (2015): Genetic Variability of Equine Milk Protein Genes. Schriftenreihe des Institutes für Tierzucht und Tierhaltung der CAU Kiel, Nr. 215, ISSN 0720-4272.

### *Erschienene Beiträge (peer-review)*

Brinkmann, J.; Koudelka, T.; Keppler, J. K.; Tholey, A.; Schwarz, K.; Thaller, G.; Tetens, J.; Lei, B. (2015): Characterization of an Equine  $\alpha$ -S2-Casein Variant Due to a 1.3 kb Deletion Spanning Two Coding Exons. *PLOS ONE* **10**: e0139700.

- Gallinat, J. L.; Qanbari, S.; Drögemüller, C.; Pimentel, E.; Thaller, G.; Tetens, J. (2013): DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. *Journal of Dairy Science* **96**: 699–709.
- Tetens, J. L.; Drögemüller, C.; Thaller, G.; Tetens, J. (2014a): DNA-based identification of novel ovine milk protein gene variants. *Small Ruminant Research* **121**: 225–231.
- Tetens, J. L.; Qanbari, S.; Drögemüller, C.; Pimentel, E. C. G.; Bennewitz, J.; Thaller, G.; Tetens, J. (2014b): Bos indicus introgression into (peri-)alpine cattle breeds - evidence from the analysis of bovine whey protein variants. *Animal Genetics* **45**: 585–588.

#### *Eingereichte Beiträge (peer-review)*

- Brinkmann, J.; Jagannathan, V.; Drögemüller, C.; Rieder, S.; Leeb, T.; Thaller, G.; Tetens, J. (2016): DNA-based analysis of protein variants reveals different genetic variability of the paralogous equine  $\beta$ -lactoglobulin genes *LGB1* and *LGB2*. *Livestock Science*.
- Brinkmann, J.; Jagannathan, V.; Drögemüller, C.; Rieder, S.; Leeb, T.; Thaller, G.; Tetens, J. (2016): Genetic variability of the equine casein genes. *Journal of Dairy Science*.

#### *Kongresseiträge*

- Gallinat, J.L.; Thaller, G.; Tetens, J. (2011): Molekulargenetische Identifizierung einer neuen Variante des bovinen  $\alpha$ -Lactalbumins bei taurinen und indicinen Rinderrassen. Vortragstagung der DGfZ und GfT Freising-Weihenstephan.
- Gallinat, J.L.; Qanbari, S.; Drögemüller, C.; Pimentel, E.C.G.; Thaller, G.; Tetens, J. (2012): Molekulargenetische Identifizierung neuer Kaseinvarianten beim Rind. Vortragstagung der DGfZ und GfT Halle / Wittenberg.
- Gallinat, J.L.; Qanbari, S.; Drögemüller, C.; Pimentel, E.C.G.; Thaller, G.; Tetens, J. (2012): Direct resequencing reveals further variability within the bovine casein genes. 33. Tagung der International Society for Animal Genetics (ISAG), ISAG, Cairns, Australia, July 15-20, Book of Abstracts S. 75-76.
- Brinkmann, J.; Thaller, G.; Krattenmacher, N.; Tetens, J. (2015): The genetic variability of equine whey proteins. 66. EAAP Tagung Warschau, Book of Abstracts No. 21, 435.

#### *Sonstige Publikationen*

- Gallinat, J.L.; Thaller, G.; Tetens, J. (2012): Spezielle Milchhaltsstoffe – Neue Perspektiven in der Rinderzucht? 6. Rinder-Workshop Uelzen, DGfZ-Schriftenreihe Heft 60, 20-28, ISSN 0949-8842.

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel AgroClustEr: FoCus – Food Chain Plus Genetische Variabilität und funktionelle Milchhaltsstoffe Abschlussbericht für das Teilprojekt 3.1 (LactoGene)	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Tetens, PD Dr. Jens Thaller, Prof. Dr. Georg	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.09.2015
	6. Veröffentlichungsdatum März 2016
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Institut für Tierzucht und Tierhaltung Christian-Albrechts-Universität Kiel Olshausenstr. 40 24098 Kiel	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 0315539A
	11. Seitenzahl 20
12. Fördernde Institution (Name, Adresse)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 46
	14. Tabelle 1
	15. Abbildungen 8
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung In den letzten Jahren sind Milchproteine aufgrund ihres Einflusses nicht nur auf den ernährungsphysiologischen Wert der Milch sondern auch auf verarbeitungstechnologische Eigenschaften von Milchprodukten in den Fokus des wirtschaftlichen Interesses gelangt. Von besonderem ernährungs- und lebensmittelwissenschaftlichem Interesse sind bioaktive Peptide, die als enzymatische Spaltprodukte von Milchproteinen während der Verdauung oder der Verarbeitung entstehen. Wichtige Effekte, die den bioaktiven Peptiden zugeschrieben werden, lassen sich mit Begriffen wie „antimikrobiell“, „immunmodulatorisch“, „tumorsuppressiv“, „antioxidativ“ oder „antihypertensiv“ umschreiben. Welche Peptide letztlich gebildet werden, hängt von der Primärstruktur der Milchproteine ab. Es gibt eine Vielzahl beschriebener genetischer Varianten, die neben den Verarbeitungseigenschaften der Milch auch die Peptidfreisetzung beeinflussen. Das wesentliche Ziel des Teilprojektes war die DNA-basierte Identifizierung von Varianten bei Rind, Schaf und Pferd sowie eine erste funktionelle Einordnung dieser Varianten und die Entwicklung züchterischer Strategien zur praktischen Nutzbarmachung der Informationen. Insbesondere den equinen Varianten kommt dabei eine zusätzliche Bedeutung zu, da Pferdemilch als hypoallergen gilt und gleichzeitig beschrieben wurde, dass bestimmte Proteinvarianten ein höheres Allergiepotezial besitzen als andere. Es wurden die milchproteinkodierenden Gene von etwa 450 Rindern aus 18 Rassen, 170 Schafen aus 8 Rassen und 250 Pferden aus 14 Rassen vergleichend untersucht. Auf diese Weise konnten beim Rind 24 bereits bekannte Varianten auf DNA-Ebene bestätigt werden, aber auch sechs bisher unbekannte Varianten identifiziert werden. Beim Schaf wurden neben 18 bereits bekannten Varianten drei neue Varianten ermittelt. Beim Pferd konnten sogar 44 verschiedene Varianten identifiziert werden, von denen 35 bisher nicht bekannt waren. Eine strukturelle Variante des equinen alpha-s2-Caseins wurde auf Transkript- und Proteinebene validiert und es wurden funktionelle Beziehungen zwischen neuen Varianten und im FoCus-Verbundprojekt identifizierten Biofunktionalitäten hergestellt.	
19. Schlagwörter Milchproteine, Caseine, Molkenproteine, genetische Variabilität, Biofunktionalität, Rind, Schaf, Pferd	
20. Verlag	21. Preis