

6 Zusammenfassung

Czernek-Schäfer, D.: Genexpression des Eutergewebes bei Kühen mit und ohne klinische Mastitis – Darstellung different exprimierter mRNAs

Mit der vorliegenden Arbeit wird ein Beitrag zur Aufklärung der genetischen und physiologischen Grundlagen der Mastitis bei der Kuh geleistet. Dafür wurden zum einen durch Mastitis signifikant beeinflusste Stoffwechselprozesse im Euter aufgedeckt und zum anderen in gesunden und kranken Eutervierteln einer Kuh unterschiedlich exprimierte Moleküle identifiziert und ihre Expression an einer Stichprobe von jeweils 10 Kühen mit und ohne klinische Mastitis untersucht. Die Identifizierung merkmalsassoziierter different exprimierter Gene stellt eine Voraussetzung für den Nachweis potentieller Kandidatengene für die Mastitisresistenz dar.

Zur Identifizierung different in gesunden und kranken Eutervierteln einer Kuh exprimierter Sequenzen wurde das Verfahren der DDRT-PCR (differential display reverse transcription polymerase chain reaction) angewendet. Unter Verwendung von 6 verschiedenen Primerkombinationen konnten 704 cDNA-Banden nach einer Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Silberfärbung dargestellt werden. Davon zeigten 532 (75,6%) cDNA-Banden Unterschiede im Auftreten bzw. in der Bandenintensität. Die 90 am deutlichsten differenten Banden wurden isoliert, reamplifiziert, kloniert und sequenziert. Insgesamt konnten 78 unterschiedliche Sequenzmotive ('expressed sequence tags', ESTs) ermittelt werden. Hiervon zeigten 58 ESTs eine Sequenzhomologie zu bereits in der EMBL-Datenbank abgelegten Sequenzen. Für 20 EST konnte keine Homologie ermittelt werden. Sie stellen 'de novo'-Sequenzen dar und sind somit ein wichtiger Beitrag zur Vervollständigung der bovinen Genbank. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu bekannten Genen konnte für 19 EST deren mögliche physiologische Bedeutung abgeleitet werden. Jeweils fünf ESTs kodieren für Proteinkinasen (*PRKDC*, *VRK2*, *STK9*, *CDK8*, *JIK*) und Gene, die in der Regulation der Genexpression von Bedeutung sind (*AHCY*, *HNRPU*, *SSR1*, *NR1D1*, *RORA*). Die restlichen ESTs repräsentieren Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (*OSTF1*, *RSC1A1*, *AHNAK*, *TP53*), Entzündungsmarker (*PLCE*, *GSAAL1*), immunrelevante Faktoren (*COVA1*, *LY75*) und einen osmotisch wirkenden Faktor (*AKR1B1*).

Mittels quantitativer und semiquantitativer Genexpressionsuntersuchungen konnten die im DDRT-PCR-Verfahren beobachteten mastitisassoziierten Veränderungen im Genexpressionsmuster bestätigt werden. Die Mastitis führt im Euter von Kühen zum Teil zu hochsignifikanten Abweichungen des Expressionsniveaus einer Vielzahl von Genen.

Alle untersuchten ESTs weisen bei den Tieren mit klinischer Mastitis eine signifikant erhöhte Variabilität der individuellen Transkriptmengen bei Vergleich mit den gesunden Tieren auf. Das deutet auf eine stark tierspezifische Reaktion auf die Mastitis hin. Signifikant erhöhte mittlere Transkriptionsniveaus bei Genen, die für Proteinkinasen (*PRKDC*, *VRK2*, *CDK8*, *STK9*, *JIK*), Wachstumsfaktoren (*OSTF1*, *RSC1A1*, *AHNAK*, *TP53*) und Faktoren, die bei der Regulation der Genexpression (*AHCY*, *HNRPU*, *SSR1*, *NR1D1*, *RORA*) eine Rolle spielen, weisen auf eine mastitisassoziierte Genexpression hin, die für hochproliferative Zellen charakteristisch ist.

Darüber hinaus führt die Mastitis zu einer signifikanten Erhöhung des Transkriptionsniveaus der 'Akute-Phase-Proteine' Phospholipase und Serumamyloid A, die in der Humanmedizin bereits als hochempfindliche Entzündungsmarker genutzt werden.

Nach Maßgabe der Lokalisation mastitisassoziiert exprimierter Gene im Bereich kartierter QTLs für den Gehalt an somatischen Zellen in der Milch können die Gene *CDK8* (BTA7), *PLCE* (BTA8), *AHCY* (BTA13), *PRKDC* (BTA14) und *HNRPU* (BTA16) als potentielle Kandidatengene der Mastitisabwehr abgeleitet werden.

7 Summary

Czernek-Schäfer, D.: Gene expression in the udder of cows with and without clinical mastitis
- description of differentially expressed mRNAs

This study was performed to contribute to a better understanding of the genetical and physiological parameters affecting mastitis in cows. The DDRT-PCR (differential display reverse transcription polymerase chain reaction) strategy was used to identify mastitis-associated ESTs (expressed sequence tags) based on their different expression pattern in tissue-samples from infected and non-infected udder quarters of a cow. Differentially expressed molecules were checked for their mastitis-associated expression in udder samples of 10 animals each with and without clinical mastitis. The identification of trait-associated differentially expressed genes is a prerequisite for the detection of potential candidate genes for mastitis resistance.

A total of 704 different cDNA bands were displayed by polyacrylamide gel electrophoresis and subsequent silver staining. Of these bands, 532 (75,6%) were differentially displayed. For a more detailed analysis 90 prominent cDNA bands were isolated, re-amplified, cloned and sequenced resulting in 78 different ESTs. Database search revealed that 58 ESTs corresponded to already known genes and ESTs. However, the remaining 20 ESTs were found to be new therefore representing a valuable contribution to the bovine gene bank. Nineteen ESTs were similar to known genes with known function. These genes encode protein kinases (*PRKDC*, *VRK2*, *STK9*, *CDK8*, *JIK*), factors involved in the regulation of gene expression (*AHCY*, *HNRPU*, *SSR1*, *NR1D1*, *RORA*), growth- and differentiation factors (*OSTF1*, *RSC1A1*, *AHNAK*, *TP53*), immune response factors (*COVA1*, *LY75*), inflammation markers (*PLCE*, *GSAAI*) and a osmosis regulatory factor (*AKR1B1*).

Mastitis-associated expression patterns of the identified ESTs could be confirmed by quantitative and semiquantitative expression analyses. Mastitis partially led to highly significant changes in expression level of many genes. Transcript levels of all ESTs analysed are characterised by an increased interindividual variability in animals with clinical mastitis compared to the control group. The significant mastitis-associated increase of the expression of genes encoding protein kinases (*PRKDC*, *VRK2*, *STK9*, *CDK8*, *JIK*), genes involved in regulation of gene expression (*AHCY*, *HNRPU*, *SSR1*, *NR1D1*, *RORA*) and growth- and

differentiation factors (*OSTF1*, *RSC1A1*, *AHNAK*, *TP53*) characterises highly proliferating cells.

In addition mastitis led to increased transcript levels of acute phase proteins phospholipase and serum amyloid A, which are used as early and sensitive inflammation markers in human medicine.

Because of the localisation of mastitis-associated expressed genes to QTL (quantitative trait loci) regions for somatic cell score in milk 5 genes are potentially involved in mastitis defence: *CDK8* (BTA7), *PLCE* (BTA8), *AHCY* (BTA13), *PRKDC* (BTA14) and *HNRPU* (BTA16).