

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein DNA-Test zur Diagnose der autosomal, monogen rezessiven Immunschwächekrankheit Bovine Leukozyten-Adhäsions-Defizienz (BLAD) in der Bundesrepublik Deutschland etabliert werden. Da einige Besamungsbullen trotz ihrer Diagnose als Anlageträger weiterhin in der Rinderzucht eingesetzt werden, erschien es sinnvoll, das Verfahren auf die Untersuchung von embryonalen Zellen anzupassen, um einen kontrollierten Einsatz dieser Bullen in ET-Programmen zur gezielten Erzeugung von Nachkommen, die frei von dem Defektallel sind, zu ermöglichen.

Der von SHUSTER et al. (1992b) beschriebene BLAD-Test, der auf dem Nachweis der verantwortlichen Mutation mittels PCR und anschließendem mutationsabhängigen Restriktionsabbau beruht, wurde durch die Auswahl neuer Primer verbessert. Diese ermöglichen einerseits eine einfachere Analyse der Ergebnisse nach Restriktionsabbau und andererseits den Einsatz einer PCR ohne Hot-Start.

Der BLAD-Test wurde zunächst für die Diagnose von vermutlich an BLAD erkrankten Kälbern und Jungrindern eingesetzt. In dieser Untersuchung von Blut- und Paraffin-eingebetteten Gewebeproben konnten 44 Tiere als BLAD-Merkmalsträger diagnostiziert werden. Andere Untersuchungsmaterialien (TG-Sperma, Haare, Milch und Speichel) wurden im BLAD-Test eingesetzt, um deren Brauchbarkeit zu prüfen und um Fehldiagnosen bei Zwillingtieren mit Blutchimärismus zu verhindern. Als Folge der eigenen Untersuchungen konnte am Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung der Tierärztlichen Hochschule Hannover das hier beschriebene Verfahren für die Routineuntersuchung zum Nachweis von BLAD-Anlage- und Merkmalsträgern für Klinik und Zuchtpraxis etabliert werden.

Zur Entwicklung des BLAD-Tests an embryonalen Zellen wurden in einem Vorversuch Embryonen aus einer gezielten Anpaarung von Anlageträgern des Erbfehlers DUMPS untersucht. Dafür wurde der im Institut zum Nachweis von DUMPS entwickelte DNA-Test durch die Primer-Extension-Preamplication (PEP) bzw. eine Heminested-PCR ergänzt. In der Heminested-PCR ergaben 12 von 13 Embryonen ein eindeutiges Ergebnis, wobei erstmals DUMPS-Merkmalsträger mit dem DNA-Test nachgewiesen wurden. Da eine Untersuchung nach PEP keine zuverlässigen Ergebnisse lieferte, wurde für den BLAD-Test an embryonalen Zellen die Heminested-PCR übernommen und in Kombination mit der Y-Chromosom-spezifischen Bov97M-Sequenz als Multiplex-PCR durchgeführt. Der kombinierte Test dauert

nur 4 Stunden und ermöglicht somit noch einen direkten Transfer der untersuchten Embryonen auf Trägartiere. Bei Verwendung von wenigen embryonalen Zellen konnte in 84 % der Untersuchungen ein BLAD- und in 92 % ein Bov97M-Fragment amplifiziert werden. Der Restriktionsabbau des BLAD-Fragments von heterozygoten Embryonen war jedoch teilweise widersprüchlich. Dies läßt sich mit dem von NAVIDI et al. (1992) beschriebenen Stichprobeneffekt erklären, der dazu führt, daß unter diesen erschwerten Reaktionsbedingungen aufgrund der niedrigen Anzahl Ausgangsmoleküle eines der beiden Allele unter Umständen nicht erkannt wird. In einem Feldversuch sollte geprüft werden, ob eine größere Biopsie diese Fehlerquelle ausschalten kann.

8 Summary

Imke Tammen:

"Improvement of the DNA test for BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) for the use in cattle breeding and clinical diagnostics."

In the present study a DNA test for diagnosis of the monogenic autosomal recessive immunodeficiency disorder bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) was established in Germany. Some proven heterozygous AI sires are still in use, therefore the BLAD test was modified for the diagnosis of embryonic cells to allow the restricted use of these bulls in embryo transfer programs for the production of offspring without the defective allele.

The BLAD test from SHUSTER et al. (1992b), which is based on the detection of the responsible mutation by restriction enzyme digestion of a CD18-PCR product, was improved by selection of new primers. They allow an easy diagnosis of the banding pattern after restriction enzyme digestion and do not require a hot start PCR.

The BLAD test was used for the diagnosis of suspected BLAD affected calves. The analysis of blood samples and paraffin embedded tissue resulted in the detection of 44 animals homozygous for BLAD. Other samples (frozen semen, hair, milk and saliva) were used in the BLAD test as a possible control for twins, where a blood chimaera may cause false diagnosis of blood samples. As a result, the Institute for Animal Breeding and Genetics of the Hannover School of Veterinary Medicine could offer this BLAD test to breeders and veterinarians for the diagnosis of carriers and affected calves.

For adjusting the BLAD test to embryonic cells, in preliminary work, embryos from intentional DUMPS-carrier mating, were analysed. The DNA test for DUMPS which was developed in our institute was therefore supplemented by primer-extension preamplification (PEP) or heminested PCR. The DUMPS genotype of 12 from 13 embryos could be determined after heminested PCR and *Ava*I digestion. For the first time, individuals homozygous for the defective DUMPS allele were detected with a DNA test. As the PEP could not give unambiguous results, the heminested PCR was chosen for the BLAD test on embryonic cells. Multiplex PCR was used to permit combination of the BLAD test with sex diagnosis based on amplification of the Y-chromosome specific Bov97M sequence. As the combined test takes only 4 hours, the direct implantation of tested embryos is possible.

Tests of the multiplex PCR system on small numbers of embryonic cells gave successful amplification for the BLAD sequence in 84 % and for the Y-chromosome specific sequence in 92 % of the embryos. The restriction enzyme digestion of the CD18 product from heterozygous embryos did not allow unambiguous determination of the genotype. A sampling effect (NAVIDI et al. 1992) is made responsible for this failure, resulting in a lack of amplification for one allele under the more complex conditions when using small amounts of template DNA. This should be further investigated in a field try in which a larger biopsy might avoid this problem.