

**Genetische Analyse des bovinen bilateralen konvergenten
Strabismus mit Exophthalmus des Holstein Rindes sowie der
equinen hereditären Mikrophthalmie**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Anke Bögeholz

geboren in Detmold

Göttingen, Oktober 2020

1. Gutachter: Prof. Dr. Jens Tetens

2. Gutachter: Prof. Dr. Cord Drögemüller

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Januar 2021

And what would humans be without love?

RARE, said Death

Terry Pratchett, Sourcery

Diese Arbeit wurde durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung gefördert.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Veröffentlichungen	II
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Allgemeine Einleitung	14
2 Genetische Analyse des bovinen bilateralen konvergenten Strabismus mit Exophthalmus des Holstein-Rindes	16
2.1 Einführung	16
2.2 Literaturübersicht.....	18
2.2.1 Boviner bilateraler konvergenter Strabismus mit Exophthalmus	18
2.2.2 Augenmuskulatur, innervierende Nerven und Ursachen für auftretenden Strabismus	20
2.2.3 Bekannte Differentialdiagnosen für Strabismus des Rindes	23
2.3 Genomweite Assoziationsstudie (GWAS) des bilateralen konvergenten Strabismus mit Exophthalmus (BCSE) bei Tieren der Rasse Braunvieh	25
2.3.1 Einleitung.....	25
2.3.2 Material und Methoden.....	25
2.3.2.1 Tiere und Phänotypen.....	25
2.3.2.2 Genotypisierung und GWAS.....	26
2.3.3 Ergebnisse	27
2.3.4 Diskussion.....	28
2.4 Kandidatengenanalyse des bovinen bilateralen konvergenten Strabismus mit Exophthalmus (BCSE) des Holstein-Rindes	31
2.4.1 Vergleichbare bekannte Erkrankung des Menschen	31
2.4.1.1 Progressive externe Ophthalmoplegie.....	31
2.4.1.2 Vergleichbarkeit PEO und BCSE, Kandidatengenansatz.....	32
2.4.1.3 Vorgegangene Studie	33
2.4.1.4 Spastic paraplegia 7 (SPG7)	34
2.4.2 Material und Methoden.....	34
2.4.2.1 Kandidatengenanalyse SPG7.....	34

2.4.2.2	Tiere und Phänotypen	34
2.4.2.3	Sequenzierung und Sequenzdaten	35
2.4.3	Ergebnisse Kandidatengenanalyse <i>SPG7</i> auf BTA 18	37
2.4.4	Diskussion	37
2.5	GWAS hits for bilateral convergent strabismus with exophthalmos in Holstein cattle using imputed sequence level genotypes.....	39
2.5.1	Introduction.....	41
2.5.2	Materials and Methods	42
2.5.2.1	Animals and clinical phenotypes	42
2.5.2.2	Histo- and neuropathological examinations	42
2.5.2.3	SNP genotyping, imputation and genome-wide association study (GWAS)	43
2.5.2.4	Evaluation of the Molecular Consequences of Amino Acid Substitutions	44
2.5.3	Results	45
2.5.3.1	Clinical phenotype	45
2.5.3.2	Pathological phenotype.....	46
2.5.3.3	Genome-wide association study and candidate genes	47
2.5.4	Discussion	50
2.5.5	Conclusions.....	53
2.6	Allgemeine Diskussion BCSE.....	60
2.7	Zusammenfassung.....	64
2.8	Summary.....	66
3	Genetische Analyse der equinen hereditären Mikrophthalmie	68
3.1	Einführung	68
3.2	Auftreten equiner Mikrophthalmie innerhalb des ersten und zweiten Fohlenjahrgangs eines jungen Holsteiner Verbandshengstes	69
3.3	Literaturübersicht.....	70
3.3.1	Holsteiner Verband.....	70
3.3.2	Mikrophthalmie	71
3.3.2.1	Equine Mikrophthalmie	73
3.3.3	Embryonale Entwicklung des Auges bei Vertebraten	74
3.3.3.1	Der genetische Hintergrund, relevante Gene im Hinblick auf die Entstehung von nicht-syndromischer Mikrophthalmie und Anophthalmie.....	78
3.4	Equine Hereditary Microphthalmia.....	82
3.4.1	Introduction.....	83

3.4.2	Material and Methods.....	85
3.4.2.1	Animals, phenotypes and genotyping.....	85
3.4.2.2	Genome wide association study	88
3.4.2.3	Candidate gene analysis RAX	88
3.4.2.4	Candidate gene analysis CDH2.....	89
3.4.3	Results	90
3.4.3.1	Genome wide association study	90
3.4.3.2	Candidate gene analysis RAX	92
3.4.3.3	Candidate gene analysis CDH2.....	94
3.4.4	Discussion.....	94
3.5	Zusammenfassung.....	101
3.6	Summary	103
4	Allgemeine Diskussion	105
5	Allgemeine Zusammenfassung	108
6	General summary	110
7	Literaturverzeichnis	112
	Danksagung.....	VI
	Eidesstattliche Erklärung	VII

II. Veröffentlichungen

Zur Veröffentlichung vorgesehene Beiträge:

GWAS hits for bilateral convergent strabismus with exophthalmos in Holstein cattle using imputed sequence level genotypes

Anke Bögeholz, Clemens Falker-Gieske, Monika Guélat, Corinne Gurtner, Sibylle Hunziker, Anna Oevermann, Georg Thaller, Cord Drögemüller and Jens Tetens

Submitted to: Genes

Equine Hereditary Microphthalmia

A. Bögeholz, C. Falker-Gieske, I. Kilic, T. Nissen, G. Thaller, C. Drögemüller, J. Tetens

In preparation for publication

Tagungsbeitrag:

A. Bögeholz, C. Falker-Gieske, G. Thaller, C. Drögemüller, J. Tetens (2019): Genomische analyse des bovinen konvergenten Strabismus mit Exophthalmus beim Holsteinrind. Tagungsband der Vortragstagung der DGfZ und GfT am 11./12. September 2019 in Gießen.

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Halbschematischer Schnitt durch die Augenhöhle und den Augapfel der Katze (modifiziert nach Salomon et al. 2008)	22
Abbildung 2: Beobachtete pathologisch veränderte Stellung der Augen bei Tieren der Rasse Braunvieh (Fotos: S. Hunziker).	26
Abbildung 3: Manhattan-Plot des negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte zur Assoziation der untersuchten SNPs mit dem Auftreten von BCSE bei Tieren der Rasse Braunvieh.....	27
Figure 1: Examples of BCSE-affected Holstein cattle.	45
Figure 2: Histopathological features of BCSE-affected Holstein cattle.....	46
Figure 3: Results of the GWAS for BCSE in Holstein cattle based on imputed sequence level genotypes.	48
Abbildung 4: Mikrophthalmisches Holsteiner Fohlen (Fotos: J. Tetens).	69
Abbildung 5: Schematische Darstellung der frühen Augenentwicklung bei Vertebraten. (modifiziert nach Schnorr und Kressin 2006).	75
Figure 4: Pedigree of the Holsteiner stallion (EMO001) with mated mares and respective offspring.....	86
Figure 5: Family structure of EMO001 with half siblings and respective offspring affected by microphthalmia	87
Figure 6: Manhattan-plot showing the negative decadic logarithms of the P values for association of SNPs genome wide with the occurrence of Microphthalmia (upper Figure) and on chromosome 8 (lower Figure).	91

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die acht quergestreiften intraorbitalen Muskeln sowie ihre innervierenden Nerven und mögliche Folgen einer Parese (König und Liebich 2005; Salomon et al. 2008; Witt 2007).	23
Tabelle 2: Liste der Primerpaare, die zur Sequenzierung aller 17 Exone des Gens SPG7 auf BTA 18 verwendet wurden.	36
Tabelle 3: Thermisches Profil der PCR im Thermocycler.....	37
Table 1: Top 20 of the genome-wide significantly associated variants ($P_{\text{Bonf}} \leq 0.05$). Bold lines indicate associations with $P_{\text{Bonf}} \leq 0.01$	49
Tabelle 4: Auswahl einzelner Gene, die an der Entstehung und Entwicklung nicht-syndromischer Mikrophthalmie und Anophthalmie beteiligt sind (Modifiziert nach (Richardson et al. 2017; Graw 2003; Plaisancié et al. 2019).	79
Table 2: Variants within the coding regions of <i>CDH2</i> that were sequenced and studied in all 48 horses.	89
Table 3: List of designed and used forward and reverse primers for sequencing all selected variants within the gene <i>CDH2</i> on chromosome 8.	90
Table 4: Genotypes of all animals of the data basis sequenced for two structural variants in the region of the <i>RAX</i> gene.	92

V. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AD	Autosomal dominant
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A3
ANT1	Adenine nucleotide translocase type 1
AR	Autosomal rezessiv
AT	Annealing Temperature
ATX1	Ataxin1
BCSE	Bilateral convergent strabismus with exophthalmos (Bilateraler konvergierender Strabismus mit Exophthalmus)
Bp	Basenpaare
BTA	Bos taurus autosome
C	Cytosin
C10orf2	Chromosome 10 open reading frame 2
Ca	Calcium
CDH2	Cadherin 2
CPEO	Chronische progressive externe Ophthalmoplegie
DCC	DCC netrin 1 receptor
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FHOD3	Formin homology 2 domain containing 3
G	Guanin
GDF3	Growth differentiation factor 3
GDF6	Growth differentiation factor 6
GRM	Genetic relationship matrix (genomische Verwandtschaftsmatrix)

GWAS	Genome-wide association study (Genomweite Assoziationsstudie)
HD	High density
HE	Haematoxylin and eosin stain (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)
ID	Identification (Identifikation)
JMJD3	Jumonji domain-containing protein 3
LD	Linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
MAB21L2	Protein mab-21 like 2
MAF	Transcription factor Maf
MFRP	Membrane frizzled-related protein
MITF	Melanocyte inducing transcription factor
mtDNA	Mitochondriale DNA
N.	Nervus
NCOR2	Nuclear receptor corepressor 2
NSCs	Neural stem cells (neurale Stammzellen)
N-Terminus	Amino-Terminus
OMIA	Online Mendelian Inheritance in Animals
OTX2	Orthodenticle homeobox 2
PAX6	Paired box 6
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEO	Progressive externe Ophthalmoplegie
PITX3	Paired like homeodomain 3
PLXNC1	Plexin C1
POLG1	DNA polymerase gamma
PRSS56	Serine Protease 56
PTCH1	Protein patched homolog 1
P-Wert	Probabilitas-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit)

RAX	Retina and anterior neural fold homeobox
RBP4	Retinol-Bindungsprotein 4
RDH13	Retinol dehydrogenase 13
RRF	Ragged-red-fibers
s	Sekunde
SCA1	Type 1 spinocerebellar ataxia
SIX6	SIX homeobox 6
SLC14A1	Solute carrier family 14 member 1
SLC25A4	Solute carrier family 25 member 4
SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors
SNP	Single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SOX2	SRY-box transcription factor 2
SPG7	Spastic paraplegia 7
STRA6	Signaling receptor and transporter of retinol 6
T	Trypsin
Tab.	Tabelle
TWKN	Twinkle mtDNA helicase
VEP	Variant effect predictor
VSX2	Visual system homeobox 2
WBFSH	World Breeding Federation for Sport Horses

1 Allgemeine Einleitung

Eine Einschränkung der Sehfähigkeit oder gar die vollständige Erblindung stellt insbesondere für Organismen mit ausgeprägter visueller Wahrnehmung eine unter Umständen massive Beeinträchtigung dar, deren Ausmaß vom Schweregrad und dem jeweiligen Manifestationsalter abhängt. Sind große Nutztiere, wie das Rind oder das Pferd von Augenerkrankungen betroffen, schränkt dies auch die jeweilige Nutzbarkeit des Tieres erheblich ein. Die Tiere können sich eventuell in ihrer Umgebung nicht zurechtfinden, sind besonders schreckhaft und unsicher. Pferde, deren Sehfähigkeit eingeschränkt ist, sind häufig nicht oder nur eingeschränkt als Reitpferde nutzbar. Große, schwere Tiere bergen zudem im täglichen Umgang ein potentiell Risiko für ihre Halter sowie andere Personen und Tiere ihres Umfeldes, da ein atypisches Verhalten der betroffenen Tiere schnell zu Verletzungen und Unfällen führen kann. Tritt eine Einschränkung bereits zu Beginn des Lebens auf, ist es möglich, dass sich das betroffene Tier an die gegebene Situation adaptiert, besondere Maßnahmen in Haltung, Nutzung und Pflege der Tiere sind aber in den meisten Fällen trotzdem nötig. Eine Adaption an die Situation und eine weitgehend sichere und uneingeschränkte Nutzbarkeit der Tiere kann vor allem dann erfolgen, wenn nur ein Auge betroffen ist und eine gewisse Sehfähigkeit bestehen bleibt. Völlig blinde Tiere sind nur in Ausnahmefällen und mit besonderen Vorkehrungen und entsprechenden Maßnahmen zu halten. Allgemein muss festgestellt werden, dass in ihrer Sehfähigkeit eingeschränkte große Nutztiere in fast allen Fällen zu einem wirtschaftlichen Schaden für ihren Halter und Züchter führen, da ihre Haltung, Nutzung und Vermarktung nicht uneingeschränkt gegeben ist. Potentiell erblichen Erkrankungen der Augen sollte daher besondere Aufmerksamkeit der Besitzer, Züchter und Wissenschaftler gewidmet werden, um eine Verbreitung in der Population möglichst zu minimieren oder zu verhindern. Auch muss hier beachtet werden, dass laut § 11b des Tierschutzgesetzes die Zucht von gegebenenfalls eingeschränkten Tieren verboten ist.

Die vorliegenden Untersuchungen zweier potentiell erblicher Augenerkrankungen bei Rind und Pferd hatten zum Ziel, kausal beteiligte Genvarianten zu identifizieren, den möglichen Vererbungsweg aufzudecken und die Entwicklung genetischer Testverfahren zu ermöglichen. Genetische Tests könnten in Zukunft genutzt werden, um mögliche Risikoanpaarungen zu vermeiden und die Frequenz des Auftretens der Erkrankungen zu verringern.

Die genetische Analyse des bovinen bilateralen konvergenten Strabismus mit Exophthalmus des Holstein-Rindes (BCSE) erfolgte mittels drei verschiedener Ansätze. Zunächst wurde eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) bei Tieren der Rasse Braunvieh durchgeführt. Des Weiteren wurde eine Kandidatengenanalyse bei Holstein-Rindern durchgeführt sowie eine GWAS bei Tieren der Rasse Holstein unter Verwendung von auf Sequenzebene imputierten Daten. Dieser Ansatz ist zur Veröffentlichung vorgesehen und liegt in der vorliegenden Arbeit in Publikationsform vor.

Die genetische Analyse der equinen hereditären Mikrophthalmie erfolgte mittels einer GWAS sowie zweier Kandidatengenansätze.

2 Genetische Analyse des bovinen bilateralen konvergenten Strabismus mit Exophthalmus des Holstein-Rindes

2.1 Einführung

Das Auftreten des bovinen bilateralen konvergenten Strabismus mit Exophthalmus, dem beidseitigen konvergierenden Schielen in Verbindung mit einem Hervortreten der Augen aus der Augenhöhle ist seit langem bekannt und wurde bereits für mehrere Rinderrassen beschrieben. Es wird von einer Erbllichkeit der Erkrankung ausgegangen. Die Erkrankung tritt sehr häufig erst ab einem Alter von über einem Jahr auf und kann in ihrem Verlauf zur völligen Erblindung der Tiere führen. Die entstehende Einschränkung der Sehfähigkeit betroffener Tiere führt häufig zu Auffälligkeiten im Verhalten der Rinder. Dieses kann in vielen Fällen zu Problemen in der Haltung und Nutzung sowie im Umgang mit den Tieren führen und hat dementsprechend einen frühzeitigen Abgang dieser, ansonsten voll leistungsfähigen, Tiere aus der Herde zur Folge (Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991; Gerst und Distl 1997; Distl und Gerst 2000). Auf Grund der späten Erstmanifestation der Erkrankung sind die aufzubringenden Aufzuchtkosten bereits in vollem Umfang angefallen und eine uneingeschränkte Nutzung der Tiere, vor allem im Bereich der Milcherzeugung, ist im weiteren Verlauf nicht mehr möglich. Daraus resultiert ein erheblicher wirtschaftlicher Schaden für den Landwirt. Auch hat das späte Alter der Erstmanifestation der Erkrankung zur Folge, dass zu diesem Zeitpunkt potentielle Merkmalsträger bereits Teil der Zuchtpopulation geworden sind und sich die Erkrankung so innerhalb der Population weiter verbreiten kann. Das frühzeitige Erkennen und der frühzeitige Ausschluss der Merkmalsträger wären aus diesen Gründen wünschenswert.

Vorangegangene Studien, welche die zugrunde liegenden genetischen Ursachen der Erkrankung untersuchten, wurden bisher nur an Tieren der Rasse Braunvieh durchgeführt (Distl et al. 1991; Distl und Gerst 2000; Hauke 2003; Mömke 2004; Mömke et al. 2008). Bislang konnte allerdings keine kausale Genvariante gefunden werden. Das Ziel dieser Untersuchung ist es, die genetische Architektur der Erkrankung bei Tieren der Rasse Holstein-Rind zu verstehen und beteiligte Genomregionen zu identifizieren. Die Identifikation der kausalen Genvariante könnte die Entwicklung eines geeigneten genetischen Tests ermöglichen, der den

Ausschluss von Merkmalsträgern aus der Zuchtpopulation gewährleistet und somit die Frequenz des Auftretens der Erkrankung senken könnte.

2.2 Literaturübersicht

2.2.1 Boviner bilateraler konvergenter Strabismus mit Exophthalmus

Im englischen lautet der Name dieser bei Rindern auftretenden Erkrankung bilateral convergent strabismus with exophthalmus, kurz BCSE. Hierbei handelt es sich um eine erbliche Erkrankung, welche die Augen der Tiere betrifft. BCSE wurde bereits in einigen verschiedenen Rinderrassen beschrieben, dazu zählen das Jersey Rind, das Deutsche Braunvieh, das Deutsche Fleckvieh und das Holstein-Rind (Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991; Gerst und Distl 1997). Betroffene Tiere zeigen eine bilaterale, symmetrische, anteromediale Rotation der Augäpfel in Verbindung mit einer Protrusion aus der Augenhöhle variabler Ausprägung (Schütz-Hänke et al. 1979; Mömke et al. 2008). Histopathologische Untersuchungen der Augen konnten keine pathologischen Veränderungen zeigen, auch konnte keine eigentliche Einschränkung der Sehfähigkeit festgestellt werden. Dennoch verursacht die Fixierung der Augen in der nicht physiologischen Stellung eine Verminderung der Sehfähigkeit in Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad der Erkrankung (Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991). Im fortgeschrittenen Stadium kann diese zur völligen Erblindung der Tiere führen, da die Pupille in anteromedialer Richtung vollständig in der Orbita verschwindet (Distl und Gerst 2000). Neuropathologische Untersuchungen des *Nervus abducens*, des VI. Hirnnerven, zeigten eine signifikant verringerte Anzahl an Nervenzellen in der Kernregion. Der *N. abducens* innerviert den *Musculus rectus lateralis*, einen seitlichen Augenmuskel, der für die Abduktion verantwortlich ist, also die Bewegung des Auges in Richtung Schläfe. Die Kernregion des *N. abducens* liegt in der Brückenhaube, im Hirnstamm. Eine reduzierte Anzahl an Nervenzellen lässt auf eine motorische Insuffizienz der innervierten Augenmuskeln schließen (Schütz-Hänke et al. 1979; Witt 2007). Histopathologische Untersuchungen des *Musculus rectus lateralis* und des *Musculus rectus medialis* zeigten so genannte Ragged-Red-Fibers (RRF), dabei handelt es sich um eine pathologische Veränderung, ein Zusammenklumpen (Agglomeration) degenerierter Mitochondrien. RRF deuten auf eine Störung des Energiestoffwechsels des betroffenen Gewebes hin (Vogt 2000; Molnar und Kovacs 2017). Das Manifestationsalter der Erkrankung variiert. In der Regel werden erste Anzeichen nicht vor einem Alter von mindestens sechs Monaten sichtbar. In vielen Fällen manifestiert sich die Erkrankung erst ab einem Alter von 1 bis 2 Jahren oder in einem noch weiter fortgeschrittenen Alter (Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991;

Distl 1993; Distl und Gerst 2000). Durch die fortschreitende Beeinträchtigung des Sehvermögens der betroffenen Tiere stellen sich Verhaltensauffälligkeiten ein, dazu zählen zum Beispiel ein sich entwickelnder unsicherer Gang, eine auffällige Schreckhaftigkeit sowie ängstliches Verhalten, was zu erheblichen Problemen im Umgang mit den betroffenen Tieren führen kann (Schütz-Hänke et al. 1979; Mömke und Distl 2007). Daraus folgend müssen ansonsten voll leistungsfähige Tiere den Bestand frühzeitig verlassen. Da BCSE bei Rindern in der Regel erst im fortgeschrittenen Alter auftritt und zu Problemen im Umgang mit den betroffenen Tieren führt, sind die entsprechenden Aufzuchtkosten bereits angefallen. Geht man von einer erblichen Komponente der Erkrankung aus, ist zu beachten, dass zu diesem Zeitpunkt potentielle Merkmalsträger möglicherweise bereits als Teil der Zuchtpopulation eingesetzt worden sind, die Erkrankung könnte so an die Nachkommen weitergegeben werden und sich somit in der Population weiter verbreiten. Mit dem Hintergrund, potentielle Merkmalsträger der Erkrankung nach Möglichkeit frühzeitig erkennen zu können, zum Beispiel mit Hilfe eines genetischen Tests, gab es in der Vergangenheit bereits verschiedene Ansätze den möglichen Erbgang und eventuell zu Grunde liegende genetische Dispositionen zu identifizieren. Eine Segregationsanalyse, die anhand von zehn Pedigrees mit insgesamt 184 Tieren der Rasse Deutsches Braunvieh durchgeführt wurde, zeigte, dass ein Modell mit einem dominant wirkenden autosomalen Einzelgen die beobachtete Segregation in der Population am besten erklären konnte (Distl 1993). Eine weitere Studie konnte drei Kandidatengene als ursächlich für BCSE bei Tieren der Rasse Deutsches Braunvieh ausschließen, die im Zusammenhang mit PEO (progressive externe Ophthalmoplegie) stehen. PEO ist eine beim Menschen bekannte Erkrankung, die zu BCSE bei Rindern vergleichbare Symptome aufweist (Hauke 2003). Eine Kopplungsanalyse, in die Informationen über 159 Tiere der Rasse Deutsches Braunvieh einfließen, konnte einen Locus auf dem bovinen Chromosomen (BTA) 5 und einen weiteren Locus auf BTA 18 identifizieren, die im Zusammenhang mit dem Auftreten von BCSE zu stehen scheinen (Mömke et al. 2008). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde eine Assoziationsstudie durchgeführt. Diese identifizierte zwei Gene auf BTA 5 und BTA 18, die als möglicherweise ursächlich für das Entstehen und die Entwicklung von BCSE bei Tieren der Rasse Deutsches Braunvieh anzusehen sind. Es konnten allerdings keine funktionellen Mutationen in den kodierenden Sequenzen dieser Gene gefunden werden (Fink et al. 2012). Bisher konnte keine kausale Genvariante eindeutig identifiziert werden.

2.2.2 Augenmuskulatur, innervierende Nerven und Ursachen für auftretenden Strabismus

Die Augenmuskulatur des Augapfels dient der Bewegung des Auges, die komplexen Bewegungen werden bei Rindern durch die Zusammenarbeit von sieben quer gestreiften intraorbitalen Muskeln gesteuert (Abb. 1). Der achte intraorbitale, quergestreifte Muskel ist der *Musculus levator palpebrae superioris*. Dieser Muskel strahlt flächenhaft in das obere Augenlid und ist für dessen Bewegungsabläufe zuständig (König und Liebich 2005; Salomon et al. 2008). Die vier geraden Augenmuskeln sowie der obere schiefe Augenmuskel (*Musculus obliquus dorsalis*) und der *Musculus retractor bulbi* entspringen kaudal in der Augenhöhle nahe der Öffnung des *Canalis opticus* und der *Fissura orbitalis* am bindegewebigen *Anulus tendineus communis* und setzen an der *Sklera* an. Der untere schiefe Augenmuskel (*Musculus obliquus ventralis*) hingegen entspringt in der *Fossa muscularis*, einer ventromedial in der Orbita gelegenen Muskelgrube des Tränenbeins (König und Liebich 2005; Witt 2007; Salomon et al. 2008). Die vier geraden Augenmuskeln werden nach ihrer Lage unterschieden, es handelt sich dabei um den *Musculus rectus dorsalis*, den *Musculus rectus ventralis*, den *Musculus rectus medialis* und den *Musculus rectus lateralis* (Tab. 1). Die Bewegungen des Auges werden durch die vier geraden Augenmuskeln, im funktionellen Zusammenwirken mit dem *Musculus retractor bulbi*, in die vier Hauptrichtungen des Blickes gelenkt. Die zwei schiefen Augenmuskeln unterstützen die Bewegungen und bewirken eine Drehbewegung um die Augenachse. Der *Musculus retractor bulbi* bewirkt ein Zurückziehen des Auges, dieser Muskel fehlt beim Menschen (König und Liebich 2005; Salomon et al. 2008). Die Innervation der an der Augenbewegung beteiligten Muskeln und des *Musculus levator palpebrae superioris* erfolgt durch drei Hirnnerven, *Nervus oculomotorius* (III Hirnnerv), *Nervus trochlearis* (IV Hirnnerv) und *Nervus abducens* (VI Hirnnerv). Das Kerngebiet des *Nervus oculomotorius* liegt im *Tegmentum mesencephali*, der Mittelhirnhaube im *Mesencephalon* (Mittelhirn). Er innerviert den *Musculus levator palpebrae superioris* sowie alle Muskeln des Augapfels, mit Ausnahme des *Musculus obliquus dorsalis*, des *Musculus rectus lateralis* und des lateralen Abschnittes des *Musculus retractor bulbi*. Der Kern des *Nervus trochlearis* liegt, wie der des III Hirnnerven, im *Tegmentum mesencephali*, in der Mittelhirnhaube. Er innerviert den *Musculus obliquus dorsalis*. Das Kerngebiet des *Nervus abducens* liegt im *Tegmentum pontis*, in der Brückenhaube im *Metencephalon* (Hinterhirn). Der *Nervus abducens* innerviert den *Musculus rectus lateralis* sowie den lateralen Abschnitt des *Musculus*

retractor bulbi (König und Liebich 2005; Salomon et al. 2008). Die Bewegung der Augen erfolgt durch kombinierte Aktionen der Augenmuskeln. Akute Lähmungen eines einzelnen Muskels, oder einer durch einen Hirnnerven innervierten Muskelgruppe sind gut zu diagnostizieren. Bei einer Parese der durch den *Nervus oculomotorius* innervierten Muskeln kommt es zu einem divergierenden ventrolateralen Strabismus. Durch die Lähmung des *Musculus levator palpebrae superioris* kann es zur Ptosis kommen, einem Herabhängen des oberen Augenlids. Eine Schädigung des *Nervus trochlearis* und eine damit verbundene Parese des *Musculus obliquus dorsalis* führt zu einer Rotation des Augapfels über ventral nach nasal. Bei runder Pupillenform des betroffenen Tieres ist diese Rotation nur am Augenhintergrund erkennbar. Eine Lähmung des *Nervus abducens* führt zu einer Parese des *Musculus rectus lateralis*, das betroffene Auge kann nicht mehr abduziert, nach außen gezogen werden. Es kommt zu einem konvergierenden Strabismus (Salomon et al. 2008; Witt 2007).

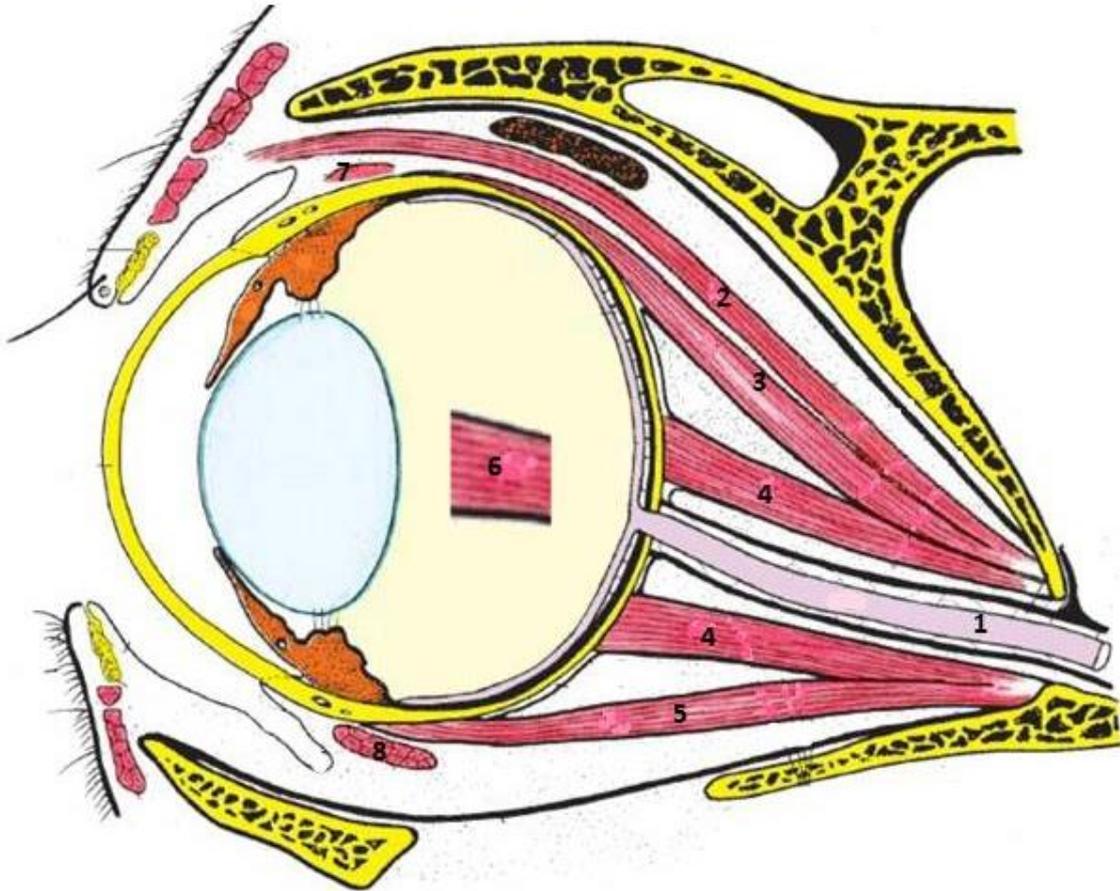


Abbildung 1: Halbschematischer Schnitt durch die Augenhöhle und den Augapfel der Katze (modifiziert nach Salomon et al. 2008)

1 *Nervus opticus*

5 *Musculus rectus ventralis*

2 *Musculus levator palpebrae superioris*

6 *Musculus rectus lateralis*

3 *Musculus rectus dorsalis*

7 *Musculus obliquus dorsalis*

4 *Musculus retractor bulbi*

8 *Musculus obliquus ventralis*

Nicht eingezeichnet der *Musculus rectus medialis*

Tabelle 1: Die acht quergestreiften intraorbitalen Muskeln sowie ihre innervierenden Nerven und mögliche Folgen einer Parese (König und Liebich 2005; Salomon et al. 2008; Witt 2007).

Muskel	Innervierender Hirnnerv	Funktion	Folgen einer Parese¹⁾
<i>Musculus levator palpebrae superioris</i>	<i>Nervus okulomotorius</i>	Bewegung des oberen Augenlids	Ptosis
<i>Musculus rectus dorsalis</i>	<i>Nervus okulomotorius</i>	Elevation, Adduktion, Innenrotation	Divergierender ventrolateraler Strabismus
<i>Musculus rectus ventralis</i>	<i>Nervus oculomotorius</i>	Depression, Innenrotation, Adduktion	Divergierender ventrolateraler Strabismus
<i>Musculus rectus medialis</i>	<i>Nervus okulomotorius</i>	Adduktion	Divergierender ventrolateraler Strabismus
<i>Musculus rectus lateralis</i>	<i>Nervus abducens</i>	Abduktion	Konvergierender Strabismus
<i>Musculus obliquus dorsalis</i>	<i>Nervus trochlearis</i>	Depression, Abduktion, Innenrotation	Rotation des Augapfels
<i>Musculus obliquus ventralis</i>	<i>Nervus okulomotorius</i>	Elevation, Abduktion, Außenrotation	Divergierender ventrolateraler Strabismus
<i>Musculus retractor bulbi</i>	<i>Nervus okulomotorius;</i> <i>Nervus abducens</i> (lateraler Abschnitt)	Zurückziehen	

¹⁾Folgen einer Parese durch Lähmung/Schädigung des innervierenden Hirnnerven

2.2.3 Bekannte Differentialdiagnosen für Strabismus des Rindes

Strabismus liegt dann vor, wenn die Sehachse der Augen nicht parallel ist. Es handelt sich somit um eine Fehlstellung beider Augen zueinander. Die häufigsten Formen des Strabismus sind der konvergierende (Richtung medial) und der divergierende (Richtung lateral). Strabismus kann unilateraler oder bilateraler, symmetrischer oder asymmetrischer

Ausprägung sein (Gelatt 2014). Bei Rindern wurden in der Vergangenheit verschiedene Formen des Strabismus und dessen mögliche Ursachen beschrieben. Eine ventromediale Rotation der Augäpfel bei jungen Rindern konnte mit einer vorliegenden Kokzidiose in Zusammenhang gebracht werden (Jubb 1988). Ursächlich für den divergierenden, unilateralen Strabismus zweier Vollgeschwister der Rasse Highland Cattle war eine Verlagerung des *Musculus rectus lateralis* um 40 Grad nach ventral (Distl und Scheider 1994). Des Weiteren wurde divergierender, bilateraler Strabismus in Verbindung mit einem *Hydrocephalus* gebracht. Bilateraler, dorsomedialer Strabismus kann ein Anzeichen einer Zerebrokortikalnekrose sein. Ipsilaterale neurologische Symptome in Verbindung mit einem medialen Strabismus können Anzeichen einer Listeriose sein. Tumoröse Prozesse, Inflammationen sowie Traumata können weitere Ursachen für das Auftreten eines Strabismus verschiedener Ausprägung sein (Gelatt 2014).

2.3 Genomweite Assoziationsstudie (GWAS) des bilateralen konvergenten Strabismus mit Exophthalmus (BCSE) bei Tieren der Rasse Braunvieh

2.3.1 Einleitung

Die durch eine pathologische Veränderung der Stellung der Augen gekennzeichnete Erkrankung BCSE wurde in der Vergangenheit bereits für verschiedene Rinderrassen beschrieben (Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991; Gerst und Distl 1997). Mit dem Ziel betroffene Tiere frühzeitig erkennen und dementsprechend aus der Zucht ausschließen zu können, wurden in der Vergangenheit verschiedene Ansätze verfolgt. Veröffentlichte Analysen, welche die zugrundeliegende Genetik der Erkrankung untersuchen, wurden bisher ausschließlich an Tieren der Rasse Braunvieh durchgeführt (Distl et al. 1991; Distl und Gerst 2000; Hauke 2003; Mömke 2004; Mömke et al. 2008; Fink et al. 2008; Fink et al. 2012). Eine Assoziationsstudie konnte zwei Gene identifizieren, die möglicherweise ursächlich für das Entstehen und die Entwicklung von BCSE bei Tieren der Rasse Braunvieh sind. Diese Gene liegen auf BTA 5 (*PLXNC1*) und BTA 18 (*RDH13*) (Fink et al. 2012).

Ziel dieser Untersuchung war es, die vorangegangenen Ergebnisse an einer Stichprobe von Tieren der Rasse Braunvieh zu reproduzieren oder aber eventuell andere möglicherweise beteiligte Regionen zu identifizieren und mit Ergebnissen aus anderen Untersuchungen zu vergleichen.

2.3.2 Material und Methoden

2.3.2.1 Tiere und Phänotypen

Für diese Studie wurden insgesamt 29 eindeutig an BCSE erkrankte, aus der Schweiz stammende Tiere der Rasse Braunvieh ausgewählt. Die Kriterien zur Auswahl wurden wie folgt festgelegt: 1) Die Erkrankung tritt bilateral auf, 2) es besteht ein simultanes Auftreten von konvergierendem Strabismus und Exophthalmus (Abb. 2). Es wurden EDTA Blutproben zur DNA Extraktion entnommen. Als Kontrolle dienten 60 aus der Schweiz stammende Tiere der Rasse Braunvieh ohne verzeichnete Augenanomalien.



Abbildung 2: Beobachtete pathologisch veränderte Stellung der Augen bei Tieren der Rasse Braunvieh (Fotos: S. Hunziker).

Oberes Bild: Tier entspricht den zugrunde gelegten Auswahlkriterien und gilt als eindeutig an BCSE erkrankt (weit fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung). Unteres Bild: Tier entspricht nicht den Auswahlkriterien.

2.3.2.2 Genotypisierung und GWAS

Alle 29 betroffenen Tiere wurden mit dem Illumina BovineHD BeadChip genotypisiert, daraus resultierend standen 777.962 SNP Marker zur weiteren Analyse zur Verfügung. Die 60 Tiere der Kontrollgruppe wurden mittels des Illumina BovineLD BeadChip genotypisiert. Es standen damit 76.883 SNP Marker zur weiteren Analyse zur Verfügung. Die vorhandenen Daten wurden zusammengefügt und einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dazu wurde die Software Plink 1.9 (Purcell et al. 2007) genutzt. Es wurden nur autosomale Marker mit einer bekannten Position (genome build UMD3.1) betrachtet und gefiltert. Die Schwellenwerte an die Datengrundlage wurden wie folgt festgelegt: 2% missing genotype per marker sowie eine minor allele frequency von 0,05. Daraus resultierend konnten insgesamt 54.223 Marker für die genomweite Assoziationsstudie genutzt werden.

Die GWAS wurde als logistische Regression mittels der Software Plink 1.9 (Purcell et al. 2007), einschließlich der ersten vier Eigenvektoren als Kovariablen zur Korrektur auf mögliche

Populationsstratifikation durchgeführt. Die einfließenden Eigenvektoren wurden durch eine Hauptkomponentenanalyse basierend auf einer genetischen Verwandtschaftsmatrix ermittelt. Die genomweite sowie die chromosomenweite Signifikanzschwelle wurde mittels der Bonferroni-Korrektur festgelegt ($P \leq 0.05/\text{Anzahl der Marker}$). Die grafische Umsetzung wurde mit R (R Core Team 2020) durchgeführt.

2.3.3 Ergebnisse

Die durchgeführte GWAS zeigte keine genomweit oder chromosomenweit signifikant mit dem Auftreten von BCSE assoziierten Signale (Abb. 3).

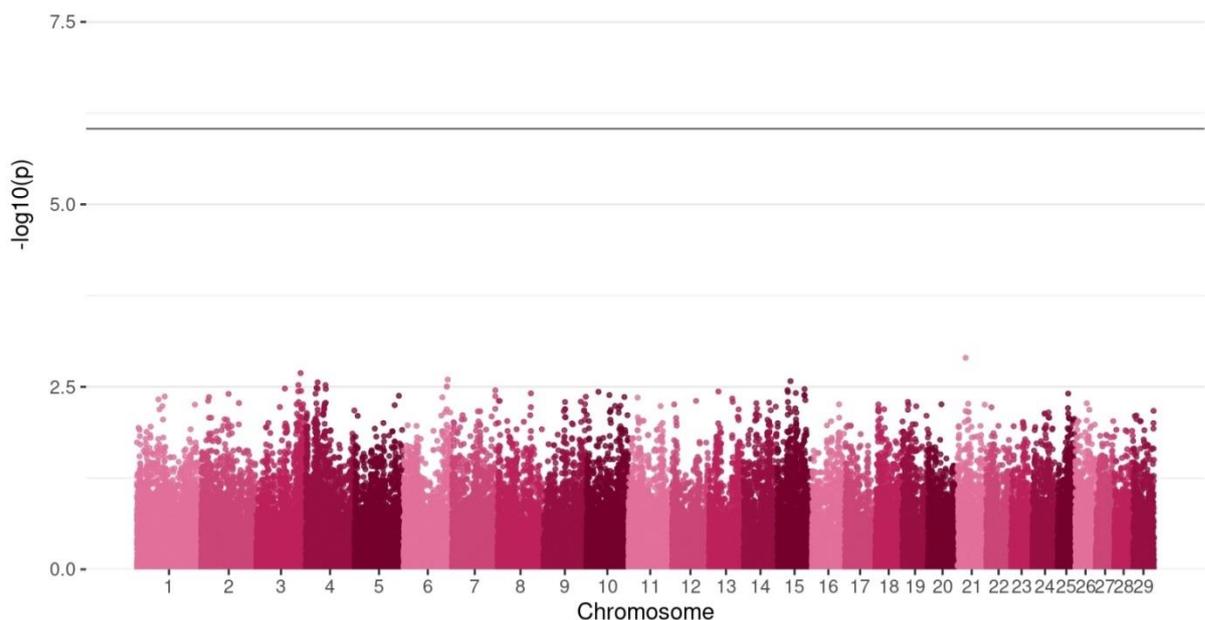


Abbildung 3: Manhattan-Plot des negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte zur Assoziation der untersuchten SNPs mit dem Auftreten von BCSE bei Tieren der Rasse Braunvieh.

2.3.4 Diskussion

Diverse in der Vergangenheit durchgeführte Untersuchungen an Rindern der Rasse Braunvieh mit dem Ziel, die genetische Architektur der Erkrankung BCSE zu verstehen und beteiligte Genomregionen zu identifizieren, konnten bislang keine kausale Genvariante eindeutig bestimmen. Eine Assoziationsstudie konnte zwei Gene, eins auf BTA 5 und eins auf BTA 18, ausfindig machen, die möglicherweise in der Entstehung der Erkrankung bei Tieren der Rasse Braunvieh eine Rolle spielen könnten (Fink et al. 2012). Die hier durchgeführte genomweite Assoziationsstudie hatte die Intention, in den zuvor beschriebenen Bereichen des bovinen Genoms signifikant mit der Erkrankung assoziierte SNPs zu finden, um die zuvor beschriebenen Bereiche eventuell bestätigen und eingrenzen zu können oder aber andere signifikant assoziierte Bereiche zu finden.

Die genutzte Datengrundlage bestand aus 29 an BCSE erkrankten Rindern der Rasse Braunvieh sowie 60 nicht erkrankten Tieren dieser Rasse. Die Auswahl der erkrankten Tiere wurde strikt anhand von Fotografien der jeweiligen Tiere durchgeführt (Abb. 2). Als Kriterien dienten das beidseitige Auftreten der Erkrankung sowie ein vorliegender Strabismus in Verbindung mit einem Exophthalmus. Mögliche Differentialdiagnosen, die eine pathologische Veränderung der Stellung der Augen zur Folge haben, konnten so möglichst ausgeschlossen werden. Zum Alter der Erstmanifestation der Erkrankung konnten für diese Tiere keine genauen Angaben gemacht werden. Des Weiteren lagen keine Informationen über das Alter der nicht erkrankten Tiere vor. Das Alter der Erstmanifestation variiert, in der Regel werden erste Anzeichen der Erkrankung nicht vor einem Alter von mindestens sechs Monaten sichtbar. In vielen Fällen werden erste Anzeichen sogar erst in deutlich weiter fortgeschrittenem Alter erkannt (Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991; Distl 1993; Distl und Gerst 2000). Ein nicht progressiv verlaufendes Auftreten der Fehlstellung der Augen von Geburt an würde gegen das Vorliegen von BCSE sprechen. Das Alter der Tiere der Kontrollgruppe sollte möglichst hoch gewählt werden, da ein mögliches Auftreten der Erkrankung im weiteren Verlauf des Lebens so unwahrscheinlicher wird. Genaue Angabe des Alters der Erstmanifestation, des Verlaufs der Erkrankung sowie das Alter der Tiere der Kontrollgruppe sollten genau dokumentiert sein, um eine mögliche Fehlerquelle in der Untersuchung ausschließen zu können.

Es wurden insgesamt 54.223 über das gesamte Genom verteilte Marker für die Assoziationsstudie genutzt. Keiner dieser Marker zeigte sich signifikant mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert (Abb. 3). Auch in den zuvor beschriebenen Regionen auf BTA 5 und BTA 18 konnten keine Assoziationen gefunden werden.

Die 29 betroffenen Tiere wurden mit dem Illumina BovineHD BeadChip genotypisiert, die nicht betroffenen Tiere mit dem Illumina BovineLD BeadChip. Es konnten nur die SNPs in die Assoziationsstudie einfließen, die durch beide Chips erfasst wurden und der durchgeführten Qualitätskontrolle entsprachen. Die Markerdichte war dadurch im Vergleich zu der möglichen Markerabdeckung, die durch eine konstante Genotypisierung mit dem HD Chip möglich gewesen wäre um rund das 14fache und damit deutlich reduziert. Eine Erhöhung der Markerabdeckung über das gesamte Genom erhöht die Wahrscheinlichkeit, eine kausale Mutation oder einen mit einer solchen Mutation gekoppelten Marker finden zu können. Eine solche Kopplung besteht, wenn Marker und Mutation nicht unabhängig voneinander vererbt werden, es besteht ein hohes oder komplettes Kopplungsungleichgewicht (LD) (Willam und Simianer 2011). In hoch selektierten Nutztierpopulationen, wie dem Braunvieh, mit einer geringen effektiven Populationsgröße und einem hohen relativen genetischen Beitrag einzelner Vorfahren (Hagger 2005) ist das LD in der Regel hoch. Wird von einer kausalen genetischen Mutation ausgegangen, welche die Erkrankung bedingt, müsste es möglich sein, einen Marker zu finden, der entweder mit einer solchen Mutation gekoppelt ist oder selbst die kausale Mutation darstellt. Je kleiner der entsprechende vom Vorfahren vererbte Haplotyp Block ist, der die betreffende Mutation enthält, desto höher muss die genutzte Markerabdeckung sein, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, diesen mittels Kopplung entdecken zu können und eine Assoziation mit dem beobachteten Phänotyp zu erhalten. Eine Erhöhung der Markerabdeckung für eine erneute Assoziationsstudie durch die Genotypisierung aller einfließenden Tiere mittels eines HD Chips oder sogar durch Imputation auf Sequenzebene wäre damit sinnvoll.

Die durchgeführte GWAS zum Auftreten von BCSE bei Tieren der Rasse Braunvieh konnte anhand der vorliegenden Datengrundlage und mit der gegebenen Markerabdeckung keine Assoziationen zwischen einem Marker und dem Auftreten der Erkrankung nachweisen. Eine größere Stichprobe an erkrankten Tieren sowie detaillierte Aufzeichnungen über die

Erkrankung selbst und das Alter aller einfließende Tiere wäre für die Durchführung weiterer Untersuchungen sinnvoll.

2.4 Kandidatengenanalyse des bovinen bilateralen konvergenten Strabismus mit Exophthalmus (BCSE) des Holstein-Rindes

2.4.1 Vergleichbare bekannte Erkrankung des Menschen

2.4.1.1 Progressive externe Ophthalmoplegie

Die progressive externe Ophthalmoplegie (PEO) ist eine bei Menschen bekannte Erkrankung, bei der es zu einer langsam progressiven, diffusen Reduktion der Motilität der Augenmuskulatur kommt. Gekennzeichnet ist diese Erkrankung häufig durch eine typische, bereits zu Beginn auftretende Ptosis, einem Herabhängen des oberen Augenlids bedingt durch eine Lähmung des *Musculus levator palpebrae superioris*. Seltene Fälle ohne auftretende Ptosis sind jedoch auch bekannt (McClelland et al. 2016; Bucelli et al. 2016). Zu Beginn der Erkrankung bleibt in einigen Fällen die eingeschränkte Motilität der Augenmuskulatur unbeobachtet. PEO tritt in vielen Fällen bilateral und symmetrisch auf, eine asymmetrische Ausprägung der Erkrankung sowie unilaterales Auftreten kommen jedoch auch vor (McClelland et al. 2016). Ein Auswärtsschielen der Patienten (*Strabismus divergens* oder Exotropie) wird häufiger beobachtet als ein Einwärtsschielen (*Strabismus convergens* oder Esotropie). Das Manifestationsalter der Erkrankung scheint in vielen Fällen in der Adoleszenz bis hin zum Erwachsenenalter zu liegen (Richardson et al. 2005; Bucelli et al. 2016; McClelland et al. 2016; Deschauer et al. 2001).

Bei der PEO handelt es sich um eine mitochondriale Enzephalomyopathie, einer Störung in der mitochondrialen Atmungskette. Mitochondriale Enzephalomyopathien zeigen sich klinisch häufig als Multisystemerkrankungen mit sehr unterschiedlichen Symptomen. Auch Patienten, die an PEO erkrankt sind, zeigen häufig zusätzliche Symptome, wie Extremitätenschwäche, Retinopathie, Reizleitungsstörungen des Herzens, Psychosyndrom und Demenz, Polyneuropathie, Kleinwuchs, Diabetes mellitus, Ataxie und Schwerhörigkeit (Deschauer 2003). Tritt die Erkrankung in weitgehend isolierter Form auf, spricht man von einer chronischen progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO), bei einer Multisystembeteiligung wird die Erkrankung als CPEO plus bezeichnet (Deschauer 2003; McClelland et al. 2016).

Die Diagnostik der PEO/CPEO erfolgt neben der Erfassung der klinischen Symptomatik durch Laboruntersuchungen. Die vorliegende Störung in der mitochondrialen Atmungskette führt zu

einem pathologisch erhöhten Laktatwert im Blut oder Liquor in Ruhe oder bereits nach leichter Belastung. In Muskelbiopsien lässt sich die Beeinträchtigung der Atmungskette histochemisch durch Cytochrom-C-Oxidase-negative Fasern nachweisen. Nach Gomöri-Trichom-Färbung können sogenannte Ragged-Red-Fibers (RRF) sichtbar werden, dabei handelt es sich um überwiegend subsarkolemmal gelegene Mitochondrien-Agglomerationen (Deschauer et al. 2001; Deschauer 2003; Pfeffer et al. 2014; McClelland et al. 2016).

PEO/CPEO tritt in hoher Frequenz sporadisch, nicht familiär gehäuft auf und weist eine hohe genetische Heterogenität auf (McClelland et al. 2016). In der mitochondrialen DNA (mtDNA) der Patienten finden sich Punktmutationen oder auch große Deletionen. Singuläre Deletionen der mtDNA treten in der Regel spontan auf, multiple Deletionen können autosomal dominant (AD) oder autosomal rezessiv (AR) vererbt werden. Diese multiplen Deletionen entstehen aufgrund vorliegender Mutationen von Genen der Kern-DNA, die sekundär durch eine Replikationsstörung der mtDNA zu einer Anhäufung dieser führen können. Für das Auftreten von PEO/CPEO verantwortliche Punktmutationen der mtDNA werden maternal vererbt (Deschauer et al. 2001; Deschauer 2003; McClelland et al. 2016).

2.4.1.2 Vergleichbarkeit PEO und BCSE, Kandidatengenansatz

Die Symptomatik der zwei Erkrankungen, PEO des Menschen und BCSE des Rindes, ähnelt sich in einigen Punkten. Bei von BCSE betroffenen Rindern kommt es zu einer progressiven, bilateralen, symmetrischen, anteriomedialen Rotation der Augäpfel und damit zu einem konvergierenden Strabismus. Dieser wird in Verbindung mit einer Protrusion, einem Heraustreten des Augapfels aus der Augenhöhle, wahrscheinlich durch die ovale Form des Rinderauges bedingt, beobachtet (Schütz-Hänke et al. 1979; Mömke und Distl 2007). Die Fixierung der Augen in dieser nicht physiologischen Stellung führt zu Einschränkungen der Sehfähigkeit und dadurch zu Veränderungen im Verhalten der Tiere. Das Manifestationsalter der Erkrankung liegt in den meisten Fällen nicht unter einem Jahr (Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991; Distl 1993; Gerst und Distl 1997; Distl und Gerst 2000). Die PEO des Menschen ist in hoher Frequenz gekennzeichnet durch eine zu Beginn der Erkrankung auftretende Ptosis, einem Herabhängen des oberen Augenlids, seltene Fälle, in denen keine

Ptosis beobachtet werden konnte sind allerdings auch bekannt (McClelland et al. 2016; Bucelli et al. 2016). Eine auftretende Ptosis wurde bei von BCSE betroffenen Rindern bisher nicht beschrieben. Im Fall von PEO kommt es zu einer langsam progressiven Verminderung der Motilität der Augenmuskulatur, was in den meisten Fällen zu einem divergierenden Strabismus führt. Ein konvergierender Strabismus wird seltener beobachtet. PEO tritt bilateral sowie unilateral auf, es kann zu symmetrischen, aber auch asymmetrischen Ausprägungen kommen. Das Manifestationsalter liegt in der Adoleszenz bis hin zum Erwachsenenalter (Deschauer et al. 2001; Richardson et al. 2005; McClelland et al. 2016; Bucelli et al. 2016). Das Krankheitsbild des BCSE des Rindes ist enger beschrieben, dennoch handelt es sich auch bei dieser Erkrankung um eine progressive Verminderung der Motilität der Augenmuskeln, die in hoher Frequenz erst in fortgeschrittenem Alter beobachtet wird. Histopathologische Untersuchungen des *Musculus rectus lateralis* und des *Musculus rectus medialis* betroffener Rinder zeigten so genannte Ragged-Red-Fibers (RRF), dieser Befund wird auch in der Diagnostik der PEO herangezogen und ist ein Anzeichen einer Störung der mitochondrialen Atmungskette (Vogt 2000; Deschauer 2003).

2.4.1.3 Vorgegangene Studie

Auf Grundlage der symptomatischen sowie diagnostischen Übereinstimmung der beiden Erkrankungen wurden in einer früheren Studie drei Kandidatengene ausgewählt, die in Verbindung mit dem Auftreten von PEO bei Menschen gebracht worden sind. Mutationen in den nukleären Genen, Twinkle mtDNA helicase (*C10orf2* oder *TWINK*), Solute carrier family 25 member 4 (*SLC25A4* oder *ANT1*) und DNA polymerase gamma (*POLG1*) führen sekundär durch entstehende Replikationsstörungen der mtDNA zu multiplen Deletionen innerhalb der mtDNA und sind damit in einigen Fällen wahrscheinlich ursächlich für das Auftreten von PEO (Deschauer und Zierz 2003; Deschauer 2003; Hauke 2003). Diese drei Kandidatengene konnten jedoch als ursächlich für das Auftreten von BCSE bei Rindern der Rasse Deutsches Braunvieh ausgeschlossen werden (Hauke 2003).

2.4.1.4 Spastic paraplegia 7 (*SPG7*)

Mutationen des Gens Spastic paraplegia 7 (*SPG7*) wurde als eine wichtige mögliche Ursache für das Auftreten von PEO im mittleren Erwachsenenalter bei Menschen beschrieben (Pfeffer et al. 2014). Mutationen innerhalb des Gens *SPG7* induzieren die mitochondriale Biogenese sowie eine Hochregulierung der Expression mitochondrialer Proteine. Histopathologisch können RRF im Skelettmuskel nachgewiesen werden. Der hohe Anteil auffindbarer mtDNA Deletionen bei betroffenen Patienten hängt wahrscheinlich mit der Segregation und klonalen Expansion bereits existierender Deletionen zusammen, die aufgrund der vorliegenden Heteroplasmie initial in der Zelle neben der Wildtyp-DNA vorliegen (Pfeffer et al. 2014; Deschauer und Zierz 2003). Eine Störung der mitochondrialen Qualitätskontrolle, an der das Protein Paraplegin eng beteiligt ist, könnte diesen Vorgang zusätzlich unterstützen. Es kommt zur Akkumulation bereits vorhandener mtDNA Mutationen und damit zur Ausprägung des PEO Phänotyps, basierend auf einer mitochondrialen Enzephalomyopathie, einer Störung der mitochondrialen Atmungskette (Pfeffer et al. 2014; Deschauer und Zierz 2003).

2.4.2 Material und Methoden

2.4.2.1 Kandidatengenanalyse *SPG7*

SPG7 wurde auf Grund seiner Beteiligung an der Entstehung der PEO des Menschen als mögliches Kandidatengen für die Entstehung und Entwicklung von BCSE bei Rindern ausgewählt.

2.4.2.2 Tiere und Phänotypen

Für die Untersuchungen standen insgesamt 73 aus Deutschland und der Schweiz stammende Holstein-Rinder zur Verfügung. Diese Tiere wiesen alle Anomalien der Augen auf, welche dem BCSE Phänotyp entsprechen. Für die DNA Extraktion wurden EDTA Blutproben der Tiere entnommen. Auf Grundlage folgender Kriterien konnten 52 Tiere als eindeutig an BCSE erkrankt eingestuft werden: 1) Die Erkrankung tritt bilateral auf, 2) es besteht ein simultanes

Auftreten von konvergierendem Strabismus und Exophthalmus, 3) das Alter der Erstmanifestation lag über 6 Monaten. Als Kontrolle wurden 95 nicht betroffene Tiere der Rasse Holstein-Rind aus den Datenbeständen genutzt, diese Tiere waren alle älter als 2 Jahre.

11 an BCSE erkrankte sowie ein nicht betroffenes Tier wurden zufällig aus der Datengrundlage der Studie ausgewählt.

2.4.2.3 Sequenzierung und Sequenzdaten

SPG7 liegt auf dem bovinen Chromosom (BTA) 18 an der Position 14.463.306-14.484.611 Basenpaare (Bp). Es verfügt über 17 codierende Exons. Mit Hilfe der Software Primer-Blast (Ye et al. 2012) konnten Primer für diese 17 Exons designt werden (Tab. 2). Die entsprechenden Primer wurden für eine PCR (Polymerase Chain Reaction) für alle zuvor ausgewählten Tiere genutzt. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des AmpliTaq Gold® 360Master Mix und des 360 GC Enhancer (Thermo Fisher Scientific) mit je 0,5 µM des jeweiligen Primers in einem Endvolumen von 50 µl amplifiziert. Die PCR wurde mittels Thermocycler durchgeführt (Tab. 3). Die DNA-Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mittels ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Sanger Sequenzierung sequenziert und die Sequenzdaten mit der bovinen Referenz UMD3.1 (genome build UMD3.1) mit Hilfe der Software Sequencher (Gene Codes Corporation 2017) verglichen.

Tabelle 2: Liste der Primerpaare, die zur Sequenzierung aller 17 Exone des Gens SPG7 auf BTA 18 verwendet wurden.

Primer ¹⁾	Exon	Primer Sequenz (5'-3')	AT ²⁾	Produktgröße (Bp)
SPG7_1F	1	TGGATTAGAGTTGCAGCGGATCG	63,4°C	548
SPG7_1R	1	CTTCGCCCTGATTTCTCCCTTG		
SPG7_2F	2	TGAATCTTGGCGCTTTCAGGAAA	61,9°C	347
SPG7_2R	2	CTCACACTGGGTAGCAGTCGAAG		
SPG7_3F	3	TCTGTTGGTTGTCTGGAAGCGTC	64,0°C	831
SPG7_3R	3	CATTCTGTTCCTGAGGTCCCA		
SPG7_4F	4	GCAGATGGGACCTCAGTGAACAG	64,5°C	609
SPG7_4R	4	CATGTGGACCCTGGACATTCGC		
SPG7_5F	5	GATGTGGAGGAGGTTGCTGAGC	60,4°C	375
SPG7_5R	5	AGTGTGAGACTCTGTTTGGACTTT		
SPG7_6F	6	GGAAAGGAGGTGGTGAGAACTGG	63,7°C	386
SPG7_6R	6	CAGGCTAGTATCCACCATGCACC		
SPG7_7F	7	ATCACTGGGTTAACGTGGGAAGC	63,6°C	483
SPG7_7R	7	ATACGGCTCAGGGAGAACAGAGT		
SPG7_8F	8	CTTCCAAGGTCGTGTCTGGATG	64,4°C	294
SPG7_8R	8	CACGGGTCTCATGTTTCCACCTT		
SPG7_9F	9	GGACTTTGAGGGTGAAGGTGGAA	63,8°C	539
SPG7_9R	9	TGACCCCACTTGATATCCCAGC		
SPG7_10F	10	TCCGTGGGAGACTTTGGCTTTTC	64,1°C	373
SPG7_10R	10	GGAACCTCAGCCCAAACGTCTCAT		
SPG7_11F	11	TCGTTTGCAGCTCTTGAGTTGGT	63,2°C	505
SPG7_11R	11	GATAACATGGAGAAGGTGGCGGG		
SPG7_12F	12	TGAAACAGTGGGTGGAAGGAAAG	62,2°C	364
SPG7_12R	12	CTGACAGAGAAGCAGGAACAGG		
SPG7_13F	13	AGTTTTGAGTGGTGGGGTCAGTG	63,1°C	481
SPG7_13R	13	TCGCCAGCAGTTCTTATTTCCA		
SPG7_14F	14	GGGGCCTCAGATTGACTTCCTTG	65,0°C	352
SPG7_14R	14	CCCACTACTTAGACCCCTCCACA		
SPG7_15F	15	GTTTAAAGGACCAGCAACAGGGC	63,5°C	473
SPG7_15R	15	TTTATTCGCTGTCCCTGATGGCC		
SPG7_16F	16	TCTTCATGTGCCTTAGTGCTGG	63,4°C	288
SPG7_16R	16	CTGGATGGGGTCTGTTGGTCATG		
SPG7_17F	17	GGAGACAGGGAGCGATTCTTTGC	62,5°C	497
SPG7_17R	17	GCAGAGCCTTTTATTCTCCAGG		

¹⁾F=Forward Primer; R=Reverse Primer²⁾AT=Annealing Temperature

Tabelle 3: Thermisches Profil der PCR im Thermocycler.

Temperatur	Dauer	Ziel	Zyklen
95°C	10 min	Denaturierung	1
95°C	30 s	Denaturierung	
55°C	30 s	Primerhybridisierung	35
72°C	30 s	Elongation	
72°C	7 min	Finale Elongation	1
4°C	∞	Kühlen	1

2.4.3 Ergebnisse Kandidatengenanalyse *SPG7* auf BTA 18

Die Sequenzdaten der codierenden Bereiche des Gens *SPG7* auf BTA 18, der zufällig ausgewählten betroffenen Tiere, zeigten keinerlei strukturelle Veränderungen oder Auffälligkeiten im Vergleich zu dem nicht betroffenen Tier der Datengrundlage und der bovinen Referenz UMD3.1.

2.4.4 Diskussion

Die Untersuchung des Kandidatengens *SPG7* konnte keinerlei strukturelle Variation innerhalb der 17 codierenden Exons der betroffenen Tiere im Vergleich zu dem nicht betroffenen Tier und der Referenz nachweisen. Da nur die codierenden Bereiche des Gens sequenziert und betrachtet wurden, kann eine Beteiligung der nicht codierenden, eventuell regulatorischen Bereiche des Gens dennoch nicht ausgeschlossen werden.

In vorangegangenen Studien konnten RRF in Muskelbiopsien betroffener Tiere nachgewiesen werden (Vogt 2000). Dieser Befund könnte auf das Vorliegen einer Störung der mitochondrialen Atmungskette hinweisen und damit die Beteiligung von *SPG7* auf die Entstehung und Entwicklung von BCSE bei Rindern möglich erscheinen lassen. Um diese These stützen zu können, wäre die histopathologische und histochemische Untersuchung weiterer

betroffener Tiere notwendig, damit das Vorliegen einer mitochondrialen Enzephalomyopathie nachgewiesen werden kann. Auch wäre eine molekulargenetische Untersuchung der mtDNA sinnvoll. Die Mitochondrien sind die einzigen subzellulären Organellen, die eine eigene DNA (mtDNA) besitzen. Diese wird, da die Oozyte weitaus mehr mtDNA enthält als ein Spermium, im Wesentlichen maternal vererbt. Es kommt zur sogenannten Heteroplasmie, einem gleichzeitigen Vorliegen mutierter und Wildtyp-mtDNA. Der Anteil mutierter mtDNA kann in von einer Mitochondriopathie betroffenem Gewebe deutlich höher liegen als in nicht betroffenem Gewebe. Man geht davon aus, dass ein bestimmter Schwellenwert an mutierter mtDNA überschritten werden muss, damit es zur Ausprägung eines Krankheitsphänotyps kommt. Liegen Mutationen der mtDNA vor, könnte die Art dieser Mutationen Hinweise auf den möglichen Erbgang der Erkrankung geben. Punktmutationen werden vorwiegend maternal vererbt, singuläre Deletionen innerhalb der mtDNA treten in der Regel spontan auf. Multiple Deletionen können ein Hinweis auf eine Mutation in einem nukleären Gen sein, welches sekundär Einfluss auf die Replikation der mtDNA haben kann (Deschauer 2003). Eine Beteiligung des nukleären Gens *SPG7* würde damit wahrscheinlich zu multiplen Deletionen innerhalb der mtDNA im betroffenen Gewebe der Augenmuskulatur erkrankter Tiere führen.

2.5 GWAS hits for bilateral convergent strabismus with exophthalmos in Holstein cattle using imputed sequence level genotypes

Anke Bögeholz¹, Clemens Falker-Gieske¹, Monika Guélat², Corinne Gurtner³, Sibylle Hunziker⁴, Anna Oevermann⁵, Georg Thaller⁶, Cord Drögemüller^{4,†} and Jens Tetens^{1,7,†,*}

¹ Department of Animal Science, Georg-August-University Göttingen, Burckhardtweg 2, 37077 Göttingen, Germany; anke.boegeholz@agr.uni-goettingen.de (A.B.), clemens.falker-gieske@uni-goettingen.de (C.F.-G.)

² Clinic for Ruminants, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bremgartenstr. 109a, 3012 Bern, Switzerland; monika.guelat@bluewin.ch

³ Institute of Animal Pathology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Länggassstr. 124, 3012 Bern, Switzerland; corinne.gurtner@vetsuisse.unibe.ch

⁴ Institute of Genetics, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bremgartenstr. 109a, 3012 Bern, Switzerland; sc_hunziker@hotmail.com (S.H.), cord.droegemueller@vetsuisse.unibe.ch (C.D.)

⁵ Division of Neurological Sciences, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bremgartenstr. 109a, 3012 Bern, Switzerland; anna.oevermann@vetsuisse.unibe.ch

⁶ Institute of Animal Breeding and Husbandry, Christian-Albrechts-University, Hermann-Rodewald-Str. 6, 24118 Kiel, Germany; gthaller@tierzucht.uni-kiel.de

⁷ Center for Integrated Breeding Research, Georg-August-University Göttingen, Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen, Germany

* Correspondence: jens.tetens@uni-goettingen.de

† These authors jointly supervised this work.

Abstract: Bilateral convergent strabismus with exophthalmos (BCSE) is a malformation of the eyes and is recognized as a mild but progressive disorder that affects cattle in the first two years of life. This most likely inherited disorder is rarely described in cattle resembling autosomal dominantly inherited forms of human progressive external ophthalmoplegia (PEO). In German Braunvieh cattle two linked genome regions were found that could be responsible for the development and/or progression of BCSE. The goal of this study was to phenotypically characterize BCSE in Holstein cattle from Germany and Switzerland as well as to identify associated genome regions by GWAS. The clinicopathological phenotype of 52 BCSE-affected Holstein cattle was in accordance with the phenotype described in German Braunvieh cattle, but in addition, signs of degeneration and cellular infiltration in the eye muscles were found. By using imputed sequence level genotype data three genome-wide significant GWAS hits were revealed on different chromosomes that were not detected by initial GWAS based on high density SNP array data highlighting the usefulness of this approach for mapping studies. The associated genome regions include the *ABCC4* gene as well as markers adjacent to the *NCOR2* and *DNAJC3* genes all illustrating possible functional candidate genes. Our results challenge a monogenic mode of inheritance and indicate a more complex inheritance of BCSE in Holstein cattle. Furthermore, in comparison to previous results from German Braunvieh cattle, it illustrates an obvious genetic heterogeneity causing BCSE in cattle. Subsequent whole genome sequencing (WGS)-based analyses might elucidate pathogenic variants in future.

Keywords: *Bos taurus*; eye disorder; development; rare disease; monogenic inheritance; histopathology; GWAS, imputation

2.5.1 Introduction

Bilateral convergent strabismus with exophthalmos (BCSE) is a most likely hereditary eye defect in cattle, which has been described in different breeds like Jersey, German Braunvieh, German Fleckvieh and Holstein cattle affecting animals at different age (Distl et al. 1991; Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Gerst and Distl 1997).

Affected animals exhibit a progressive mostly bilateral symmetric antero-medial rotation of the eyes associated with a variable protrusion of the eyeballs (Schütz-Hänke et al. 1979; Mömke et al. 2008). The fixation of the bulbi causes visual impairment (Distl et al. 1991; Schütz-Hänke et al. 1979) and can lead to complete blindness in advanced cases due to the disappearance of the pupils behind the antero-medial angle of the orbit (Distl and Gerst 2000) (Figure 1). A significantly decreased number of neurons in the core region of the *N. abducens* (VIth cranial nerve) that controls the movement of the *M. rectus lateralis* was observed that leads to motoric insufficiency of the innervated muscles (Schütz-Hänke et al. 1979). Histopathological examinations of the *Mm. recti lateralis et medialis* later revealed the presence of so called “ragged-red-fibres” (RRF), a pathological accumulation of degenerated mitochondria in affected fibres, which indicates a lack of energy supply (Vogt 2000).

The age of onset of bovine BCSE varies, but in most cases, clinical findings were not reported until the age of six months. Frequently, early symptoms do not occur until the age of one to two years or even later in life (Distl et al. 1991; Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl and Gerst 2000; Distl 1993). The impaired vision in affected animals leads to changes in behavior such as unsecure gait, jumpiness and shyness (Schütz-Hänke et al. 1979; Mömke and Distl 2007). This causes problems in handling especially in loose housing systems or when animals are turned out to pasture from tie-stalls. Therefore, otherwise healthy animals have to be culled early. As the disorder usually manifests in adult animals, rearing costs have been spent and potential carriers have already been used for breeding.

A genetic origin for bovine BCSE is suspected although the exact mode of inheritance as well as the molecular cause of BCSE remain unknown. Segregation analyses performed in German Braunvieh cattle showed that a model of a single dominantly inherited autosomal gene could best explain the observed segregation of BCSE (Distl 1993). In a microsatellite-based genome scan in Brown Swiss cattle, two BCSE-linked genome regions were identified on bovine chromosome 5 and 18, respectively (Mömke et al. 2008). Based on these findings, two positional candidate genes were identified to be associated with BCSE, but so far no causative

variant was found (Fink et al. 2012). In addition, three genes implicated in different forms of autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (PEO; OMIM 157640), a very similar condition in humans with progressive bilateral ptosis and diffuse symmetric reduction in ocular motility (McClelland et al. 2016), were analysed as functional candidate genes for the occurrence of BCSE in German Braunvieh cattle, but no associated variants were identified (Hauke 2003).

Considering that previous genetic studies were limited to German Braunvieh cattle, the aim of the current study was to phenotypically characterize BCSE-affected Holstein cattle as well as to identify genome regions associated with BCSE in this breed. A GWAS approach based on high density SNP array data as well as imputed sequence level genotypes was applied.

2.5.2 Materials and Methods

2.5.2.1 Animals and clinical phenotypes

A total of 73 German and Swiss Holstein cows from different herds sporadically reported with eye anomalies resembling BCSE but otherwise healthy were examined and EDTA blood samples for DNA extraction were drawn. A total of 52 clinically unambiguously affected animals were selected as cases for the genetic study, based on the following three criteria: (I) bilateral manifestation, (II) simultaneous occurrence of convergent strabismus and exophthalmos, and (III) an age of onset of more than 6 months. In addition, 95 control animals of more than two years of age with no reported history of BCSE were selected from our data repository.

2.5.2.2 Histo- and neuropathological examinations

Two of the affected animals (Figure 1) used in our study were available for histopathological and one of these for neuropathological examination. As prior studies reported pathological changes in the *N. abducens* and the *Mm. recti lateralis et medialis*, all seven ocular muscles as well as the ocular globes of two affected animals were examined histologically. Gross examination and microscopic examination with haematoxylin and eosin stain (HE) was conducted. After longitudinal and cross section of muscle fibres, pictures were taken of the

M. retractor bulbi, the *M. rectus lateralis* and the *M. rectus dorsalis* (Figure 2). Furthermore, the *N. opticus*, the *N. oculomotorius*, the *Chiasma opticum*, the *Tractus opticus*, the *Mesencephalon*, the *Medulla oblongata* including the *Nuclei vestibulares* and the *Nucleus nervi oculomotorii*, the *Thalamus* including the *Corpus geniculatum laterale* and the *Lobus occipitalis* were examined neuropathologically in one animal.

2.5.2.3 SNP genotyping, imputation and genome-wide association study (GWAS)

All animals were genotyped using the Illumina BovineHD BeadChip comprising a total of 777,962 markers. Quality control was accomplished using Plink 1.9 (Purcell et al. 2007). Only autosomal markers with a known position according to genome build UMD3.1 were kept and filtered using thresholds of 2% missing genotypes per marker and a minor allele frequency of 0.05. This resulted in a total of 543,241 SNPs remaining for further analyses. Based on these genotypes, all animals were imputed to sequence level, using the Run 5 of the database of the 1000 Bull Genomes consortium as a reference panel, comprising data for 1,682 animals of around 70 different breeds and over 60 Million variants (Hayes and Daetwyler 2019). Imputation to full genome sequence was accomplished using the software Beagle 5.0 with default parameters (Browning et al. 2018). After filtering for minor allele frequency with a threshold of 0.05, 10,772,372 imputed variants remained for further analyses.

A genome wide single marker association analysis was conducted as a logistic regression as implemented in Plink 1.9 (Purcell et al. 2007). To correct for possible stratification, a multidimensional scaling as also implemented in Plink 1.9 (Purcell et al. 2007) was conducted using a genomic relationship matrix based on the high density SNP array data and the first four axes of variation were included as covariates in the model. The number of dimensions to include was determined by visual inspection of a scree plot. The genome wide significance threshold was determined by Bonferroni correction ($P \leq 0.05/\text{number of markers}$). Visualisation was carried out with R (R Core Team 2020; Phanstiel 2021). Significantly associated sequence variants were subjected to variant effect prediction using the VEP pipeline provided by Ensembl (<https://www.en-sembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>) based on annotation release 94 for the bovine UMD3.1 genome assembly (http://oct2018.archive.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index).

2.5.2.4 Evaluation of the Molecular Consequences of Amino Acid Substitutions

SIFT (Sim et al. 2012) was used to predict the biological consequences of variants on protein level.

2.5.3 Results

2.5.3.1 Clinical phenotype

Out of 73 German and Swiss Holstein cows reported with eye anomalies resembling BCSE, 52 unambiguously affected animals (Figure 1) were selected as cases for the genetic analysis. Twenty-one BCSE-suspicious animals were excluded because the assessment of the medical condition by means of photographs and recorded case history showed that they did not fit the three underlying criteria of bilateral manifestation, simultaneous occurrence of convergent strabismus and exophthalmos.



Figure 1: Examples of BCSE-affected Holstein cattle. (A) Nine-month old female Holstein heifer with moderate BCSE; (B). Eight-month old female Red Holstein heifer with moderate BCSE; (C+D) Two-and-a-half year old Red Holstein cow in first lactation with severe BCSE. The first two cases were subjected to histopathological and neuropathological examination.

2.5.3.2 Pathological phenotype

Gross examination of the head of the two examined animals revealed a ventromedial strabismus. Ocular muscles and globes were unremarkable on gross examination. All seven eye muscles of the two examined cases showed similar histological changes of moderate to severe degeneration and regeneration (Figure 2). Multifocally, myocytes were hypereosinophilic with loss of cross striation and on cross section, groups of fibres appeared smaller in size and angular, which is compatible with atrophy of these fibres. Some myocytes showed pale eosinophilic change of the sarcoplasm (hyaline degeneration) and few degenerated myocytes were surrounded by macrophages. There were optically empty spaces separating the fibres and bundles of fibres. Rowing and internalization of nuclei indicate scarce regeneration of myocytes. Multifocally, perivascular infiltrates composed of lymphocytes, macrophages and fewer plasma cells and sparse neutrophilic and eosinophilic granulocytes. The left *M. retractor bulbi* of one animal did show only mild signs of degeneration and cellular infiltration. The neuropathological examination of one BCSE-affected animal did not reveal any morphological changes.

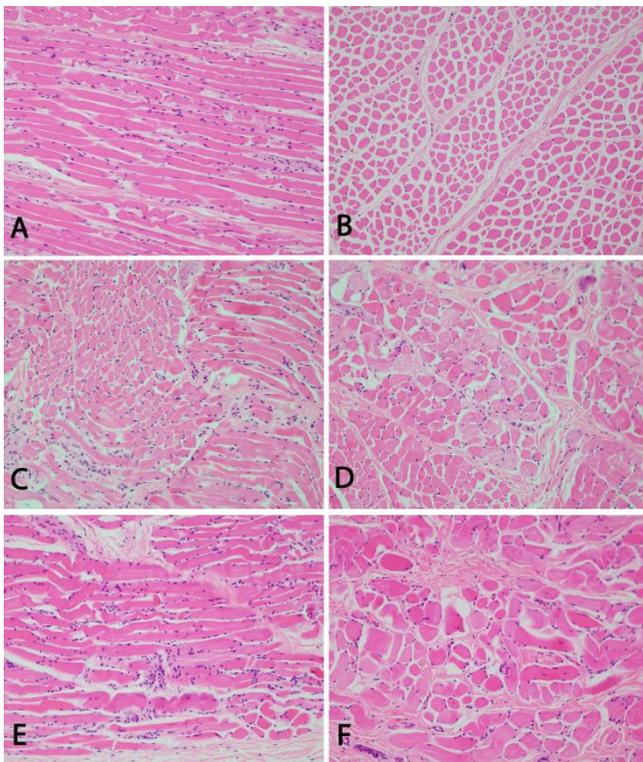


Figure 2: Histopathological features of BCSE-affected Holstein cattle. Longitudinal (A) and cross (B) sections of muscle fibres of the *M. retractor bulbi*. The cross section (B) shows mild variation in size and cellular infiltrates. Longitudinal (C) and cross (D) sections of muscle fibres of the *M. rectus lateralis* show a moderate degeneration

and atrophy with size variation of fibres. Severe degeneration with internalization of satellite cells and prominent variation in fibre size are seen in the longitudinal (E) and cross (F) sections of muscle fibres of the *M. rectus dorsalis*. 200x magnification, HE stain.

2.5.3.3 Genome-wide association study and candidate genes

Initially, a GWAS including 52 affected animals and 95 controls was carried out using the pruned Illumina BovineHD BeadChip data comprising 543,241 autosomal SNP markers, but no genome-wide significant association signals were detected. In a second step, a GWAS was carried out based on imputed sequence level genotypes considering a total of 10,772,372 imputed SNP and InDel markers after filtering (Figure 3 and Table 1). This led to the discovery of significantly associated SNPs located at three different genome regions on chromosome 2, 12 and 17 (Figure 3A). In total, 222 SNPs were above the genome-wide significance level (Table 1 and Additional file 1). On chromosome 2, six SNPs were above the genome-wide significance level, located within a stretch of 4,591 base pairs (bp) ranging from 100,672,388 to 100,676,979 bp. On chromosome 12, a total of 211 SNPs were surpassing the genome-wide significance threshold, located between 74,836,987 and 74,930,904 bp. On chromosome 17, five genome-wide significantly associated SNPs were detected between 51,125,772 and 51,356,292 bp (Figure 3).

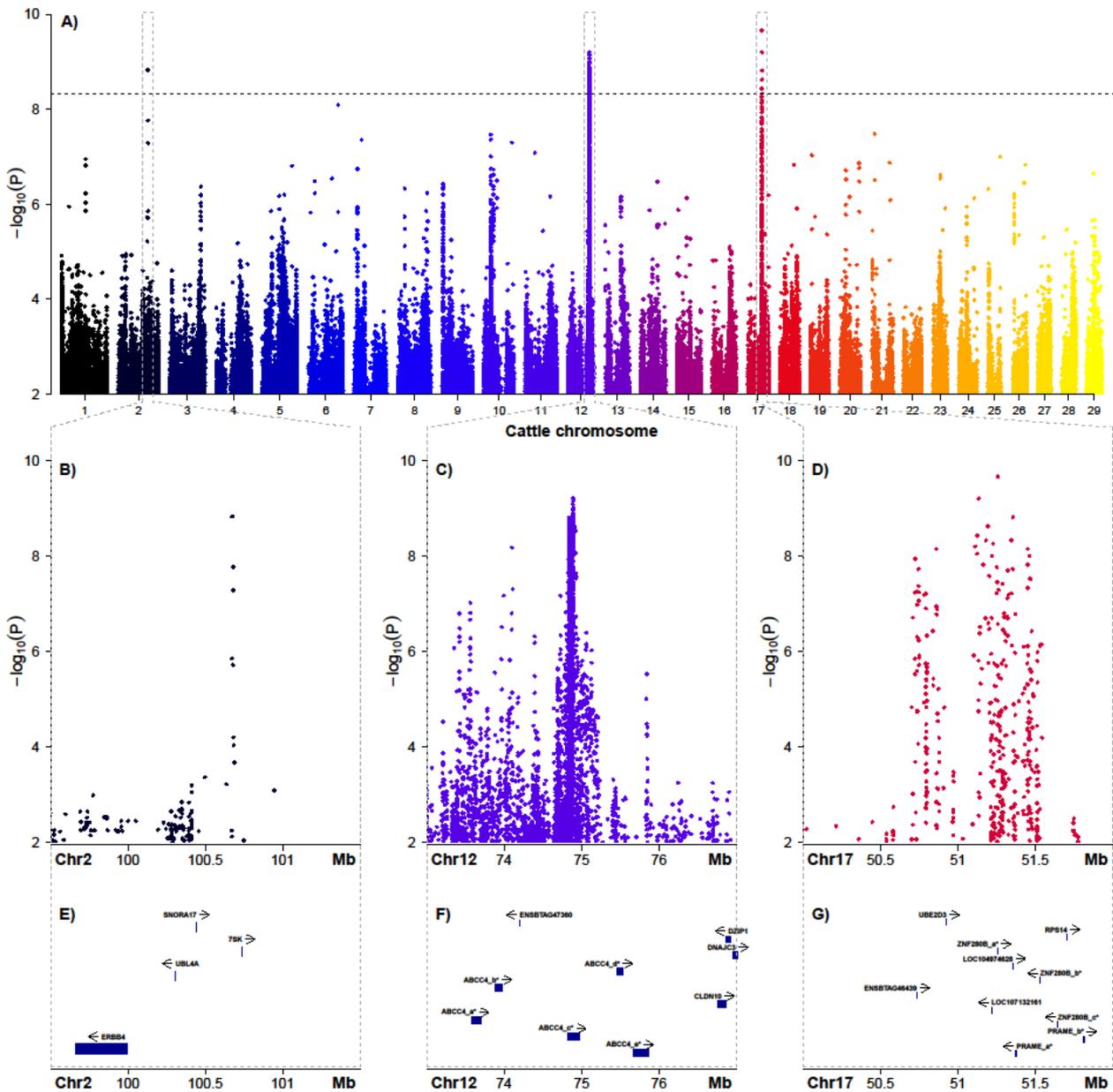


Figure 3: Results of the GWAS for BCSE in Holstein cattle based on imputed sequence level genotypes. (A) Genome-wide Manhattan plot of the GWAS results depicting the negative decadic logarithms of the p-values with respect to genomic position (UMD3.1). The horizontal dashed line represents the genome-wide significance threshold according to Bonferroni correction ($p_{\text{Bonf}} < 0.05$). Zoom into the three genome-wide significantly associated genome regions on chromosome (Chr) 2 (B), 12 (C), and 17 (D). Gene content of the three BCSE-associated genome regions on Chr 2 (E), 12 (F), and 17 (F) according to Ensembl release 94 (UMD3.1, https://oct2018.archive.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index). Where no cattle gene symbols were available, human orthologue information was used or otherwise only the Ensembl ID is given. Note that genes marked with an asterisk and a subsequent letter do represent multiple genes annotated in the cattle genome with the same human orthologue. For further details see Additional file 2.

Table 1: Top 20 of the genome-wide significantly associated variants ($P_{\text{Bonf}} \leq 0.05$). Bold lines indicate associations with $P_{\text{Bonf}} \leq 0.01$

Chr	rsID	Position [bp] ¹	Alleles ²	MAF ³	Odds ratio	P-value ⁴	VEP ⁵	Gene ⁶
2	rs136316260	100,672,388	G/T	0.17	38.75	1.49E-09	intergenic	
2	rs134704382	100,674,312	G/A	0.17	38.75	1.49E-09	intergenic	
2	rs135186290	100,675,331	A/G	0.17	38.75	1.49E-09	intergenic	
2	rs134623922	100,675,365	G/A	0.17	38.75	1.49E-09	intergenic	
2	rs385880764	100,675,837	-/ATC	0.17	38.75	1.49E-09	intergenic	
2	rs133964128	100,676,979	A/G	0.17	38.75	1.49E-09	intergenic	
12	rs377992474	74,888,457	T/A	0.34	9.90	8.36E-10	intron	ABCC4
12	rs468443940	74,891,825	T/G	0.36	8.76	1.28E-09	intron	ABCC4
12	rs381451112	74,892,681	C/G	0.34	10.78	1.41E-09	intron	ABCC4
12	rs383448105	74,892,723	A/G	0.34	10.04	6.27E-10	intron	ABCC4
12	rs378170580	74,892,729	T/G	0.34	10.84	1.00E-09	intron	ABCC4
12	rs384157620	74,892,843	A/G	0.34	9.68	1.09E-09	intron	ABCC4
12	rs110869430	74,893,319	T/G	0.33	9.70	7.05E-10	intron	ABCC4
12	rs109771712	74,893,351	C/G	0.32	9.64	9.94E-10	intron	ABCC4
12	rs876085957	74,893,362	C/T	0.34	9.86	1.09E-09	intron	ABCC4
12	rs110191959	74,894,971	A/G	0.31	12.26	1.46E-09	intron	ABCC4
12	rs384153179	74,895,060	T/C	0.32	11.94	1.55E-09	intron	ABCC4
17	rs451202354	51,135,057	C/T	0.17	153.30	6.29E-10	intergenic	
17	rs384954012	51,259,815	A/-	0.17	90.24	2.17E-10	intergenic	
17	rs377905476	51,356,292	G/T	0.18	45.64	1.53E-09	splice region	ENSBTAG00000046306

¹ Genome assembly UMD 3.1; ² minor allele given first; ³ minor allele frequency; ⁴ raw p-value; ⁵ variant effect prediction (VEP). For further details see additional files 1 and 2.

None of the significantly associated variants at 100.7 Mb on chromosome 2 is located within a gene (Figure 3E). Most of the 211 best-associated variants on chromosome 12 at 74.9 Mb are located within introns of the *ABCC4* gene (*ATP-binding cassette subfamily C member 4*, ENSBTAG00000023309) (Figure 3F; Table 1 and Additional file 1). Among the other significantly associated markers in the region of the *ABCC4* gene are also coding variants such as a splice region variant (rs379903332), a synonymous variant (rs378129168), and two missense variants, namely p.Thr281Ile (rs385235934) and p.Ala360Thr (rs378531064). Notably, the p.Thr281Ile exchange affects a conserved residue and is predicted to be deleterious with a SIFT score of zero. In addition, one of the significantly associated variants located on chromosome 17 (rs377905476) is a splice region variant within the unknown gene ENSBTAG00000046306.

2.5.4 Discussion

Sporadic cases of anomalies in cattle that are not visible at birth but manifest later in life are mostly not reported or if so, not further investigated in detail. Nonetheless, affected animals might be impaired in production or health. In this study, we performed a comprehensive clinical, pathological, and genetic investigation of Holstein cows from Germany and Switzerland showing BCSE, a possibly inherited eye disorder that was previously described in German Braunvieh cattle. It is postulated that this bovine condition resembles human progressive external ophthalmoplegia (PEO) representing a rare disease of heterogeneous origin.

In this study, the BCSE condition in Holstein cows was characterized clinically as well as histo- and neuropathologically. The obtained results confirmed the findings that were presented before in BCSE-affected German Braunvieh cattle. Histopathological examination of the ocular muscles of two BCSE-affected Holstein cows did reveal signs of degeneration and cellular infiltration. This could resemble human ocular myositis, which is described as an idiopathic inflammation of the extraocular muscles and can be a cause for strabismus (Schooser 2007). Previous studies have, however, shown the presence of RRFs in ocular muscles of affected animals (Vogt 2000). The appearance of these fibers is due to the accumulation of abnormal mitochondria, which can result from mitochondrial defects, but also from other conditions impairing muscle metabolism. As previously postulated this resembles inherited forms of human progressive external ophthalmoplegia (PEO) (McClelland et al. 2016; Visuttijai et al. 2021). We were, however, not able to verify the presence of RRFs in our samples as it was not possible to produce the required Gomori trichrome stained cryosections from our material. The findings in conjunction with the angular appearance of the defect could also support the hypothesis that muscular atrophy and the resulting motoric insufficiency might be associated with neurodegenerative processes. The neuropathological examination did not, however, reveal morphological changes.

A total of 52 clinically affected animals, collected in two different countries, were used as cases in the GWAS. While 21 of these were directly diagnosed with BCSE by one of the investigators, the assessment of the remaining animals was only possible based on owner records and photographs. In order to include only unambiguously affected cases, the selection took place based on three stringent criteria including bilateral strabismus, simultaneous convergent strabismus and exophthalmos, and first appearance at age > 6 months. This resulted in

additional 31 animals to be included and 21 animals that were considered as BCSE-affected further. This strict procedure was necessary, because several other possible causes of strabismus or exophthalmos are discussed (Mömke and Distl 2007). Abnormalities in globe position in cattle can be found bi- or unilaterally and as convergent or divergent strabismus. Bilateral divergent strabismus for example may occur in association with hydrocephalus. Bilateral dorsomedial strabismus is suggestive of polioencephalomalacia (Gelatt 2014). Unilateral strabismus can be caused by tumors, inflammation or traumata. A total of 95 unaffected animals were selected as control for GWAS from our data repository. There were no anomalies of the eyes reported for those animals and they were selected to be more than two years old to exclude animals with mild initial signs of BCSE.

The initial GWAS using 543,241 markers from a high-density SNP array did not reveal any significant association signal. Subsequently, after extension of the GWAS data by imputation to sequence level revealing genotypes for more than 10.8 million of SNPs and InDels, three genome-wide significant association signals located on different chromosomes were detected. The associated regions on chromosome 2, 12 and 17 are not in line with previous mapping results for BCSE performed in German Braunvieh cattle (Mömke et al. 2008; Fink et al. 2012). In that population, positional cloning showed linkage to other genomic regions on two different bovine chromosomes indicating an independent genetic origin of BCSE in the Holstein breed.

Although linkage disequilibrium (LD) can be considered high in the modern global Holstein population (Qanbari et al. 2010), marker density of the used high density array was apparently too low to obtain significant association for BCSE. Given the number of ~550k informative SNPs included in the study, the average inter-marker distance is approximately 5kb. Interestingly, the finally obtained association signal on chromosome 2 falls into a 60kb gap in array-marker coverage. The same holds true for the GWAS hit on chromosome 12 as there was only one marker located between 74 and 75 Mb in the initial dataset. Also, the association signal on chromosome 17 is located in a coverage gap of roughly 500kb without any marker of the high-density array. The size of the gap on chromosome 2 is in a range similar to inter-marker distances on medium density SNP-arrays, which might indicate that haplotype blocks containing causative variants are rather small and represent historically distant events of mutation (Qanbari et al. 2010; Flury et al. 2010; Gibbs et al. 2009). The other gaps are rather large, which prevents detection of the association signals. Given that the accuracy of

imputation in the scenario implemented here can be considered high (van Binsbergen et al. 2014), the chosen approach nicely demonstrates the usefulness of imputed sequence level genotypes in mapping studies.

The final GWAS results indicate possible genetic heterogeneity causing BCSE in Holstein cattle. Because all significantly associated variants located on chromosome 2 are intergenic, and those on chromosome 17 are located within a protein coding gene of unknown function (ENSBTAG00000046306), we speculate that the association signal on chromosome 12 located in the region of the bovine *ABCC4* gene might be of special interest. The *ABCC4* gene codes for the multi drug resistance protein 4 (MRP4), which acts as an export pump that contributes to cellular detoxification (Russel et al. 2008) and thus has important implications in drug pharmacokinetics (Berthier et al. 2019). However, a functional link with the development of BCSE remains inconclusive. The encoded MRP4 protein belongs to a large family of transmembrane proteins, the C subfamily of ABC transporters, involved in active transport of substrates out of cells by functioning as an efflux pump. MRP4 transports a wide variety of compounds out of cells, some of which usually induce oxidative stress (Grewal et al. 2017). Despite the fact that *Mrp4*-deficient mice are born viable and do not show any obvious anomalies, it is known that they express abnormal reactions to various types of stress including retinal dystrophy (Matsumiya et al. 2012). Therefore, it was recently stated that MRP4 may play a role in the process of aging (Kim et al. 2021). In light of the obtained GWAS results one could therefore speculate that variants in the bovine *ABCC4* might have an impact on the development of BCSE in cattle, an anomaly that continuously progresses during aging. As the animals are, however, still comparatively young at the age of onset, this remains speculative.

The fact that the GWAS was conducted using imputed sequence level genotypes has, however, to be taken into account. Although the disease appears to be quite common in Holstein cattle, it seems unlikely that the putative causative variant(s) is/are contained in the reference panel and cannot be imputed. Thus, we screened the vicinity of the GWAS signals for other functionally plausible candidate genes.

On chromosome 17, the *NCOR2* (*nuclear receptor corepressor 2*) gene is located about 2 Mb downstream of the association signal. *NCOR2* is a corepressor, which influences multiple physiological pathways. It is a silencing-mediator for retinoid and thyroid hormone receptors, therefore the alternative name SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone

Receptors). NCOR2 has a wide-ranging role in developmental as well as homeostatic processes (Mottis et al. 2013; Chen and Evans 1995). For example, an analysis of *SMRT* knock-out mice revealed that SMRT plays a critical role in forebrain development and also in maintenance of the neural stem cell state (Jepsen et al. 2007). SMRT represses the expression of the *JMJD3* gene that functions as a histone H3 trimethyl K27 demethylase which acts as a critical activator of neurogenesis from adult subventricular zone neural stem cells (NSCs) and therefore takes part in the epigenetic mechanisms that enable lifelong neurogenesis from (NSCs) (Jepsen et al. 2007; Park et al. 2014). Furthermore, Ataxin 1 (ATX1), a polyglutamine protein whose mutant form causes type 1 spinocerebellar ataxia (SCA1) in humans (OMIM 164400), was found to be functionally linked to SMRT (Tsai et al. 2004). SCA1 is a progressive neurodegenerative disease in humans pathologically characterized by ataxia, progressive motor deterioration and loss of Purkinje cells (Tsai et al. 2004; Zoghbi and Orr 2000). Those results indicate that SMRT has many biological properties that in some cases can be associated with neurodegenerative conditions. In order to establish a potential functional link with BCSE, however, the hypothesis that the disease is of neurodegenerative origin and not due to myositis needs to be further tested.

Finally, approximately 2 Mb downstream of the association signal on chromosome 12, the *DNAJC3* (*DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C3*) gene is located. This gene has been mainly implicated in the development of diabetes (Synofzik et al. 2014; Ozon et al. 2020), but also neurodegeneration (Synofzik et al. 2014). The pathomechanism of diabetes caused by *DNAJC3* mutations further involves mitochondrial degeneration (Lytrivi et al. 2021). Thus, it could be speculated that also this gene might be functionally linked to the development of BCSE in cattle.

2.5.5 Conclusions

For the first time a cohort of BCSE-affected cows in the Holstein breed is presented. The clinicopathological phenotype is highly similar to BCSE described in German Braunvieh cattle and demonstrated degeneration and cellular infiltration in the eye muscles. Only by using imputed sequence level genotype data genome-wide significant GWAS hits were revealed on

three different chromosomes highlighting the usefulness of this approach for mapping studies. The associated genome regions include the *ABCC4* gene as well as markers adjacent to the *NCOR2* and *DNAJC3* genes. Our results challenge the claim of a monogenic mode of inheritance and suggest a more complex inheritance of BCSE in Holstein cattle. Furthermore, in comparison to previous results from German Braunvieh cattle, it illustrates an obvious genetic heterogeneity causing BSCE in cattle.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Additional file 1: Variants genome-wide significantly associated ($P_{Bonf} \leq 0.05$) with BCSE. For each variant, rsID, position, association results and variant effect prediction are given. Bold faced lines indicate variants with $P_{Bonf} \leq 0.01$. Additional File 2: Genes located in the associated genome regions on BTA2, 12, and 17 (see also Figure 3).

Author Contributions: Conceptualization, C.D. and J.T.; methodology, J.T., C.F.-G. and C.D.; bioinformatics, C.F.-G.; formal analysis, A.B.; investigation, A.B., M.G., C.G., A.O. and S.H.; resources, C.D., J.T. and G.T.; writing—original draft preparation, A.B., C.D. and J.T.; writing review and editing, J.T. and C.D.; visualization, A.B., C.F.-G. and J.T.; supervision, C.D. and J.T.; funding acquisition, C.D, J.T. and G.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: A.B. received a scholarship from the H. Wilhelm Schaumann Foundation, Hamburg, Germany. APCs were covered by the Open Access Publication Funds of Göttingen University.

Institutional Review Board Statement: Collection of samples from affected animals in Germany was approved by the Ministry for Energy, Agriculture, the Environment, Nature and Digitalization Schleswig-Holstein, Germany, within the trials registered under file numbers V 244-7224.121-25 and V 242 - 56617/2016. The study was approved by the Cantonal Committee for Animal Experiments (Canton of Bern; permit BE75/16) at the University of Bern.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data are available upon reasonable request from the corresponding author. Genotype data obtained from the 1000 Bull Genomes Consortium as reference for imputation is not publically available.

Acknowledgments: The authors would like to thank Johanna Bräunert for collecting samples from affected animals in Germany. Furthermore, we would cordially like to thank all involved farmers in Germany and Switzerland, who reported cases and allowed us to examine and sample their animals. The authors thank the participants of the 1000 Bull Genomes Project for providing sequence data.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

Berthier, Joseph; Arnion, Hélène; Saint-Marcoux, Franck; Picard, Nicolas (2019): Multidrug resistance-associated protein 4 in pharmacology: Overview of its contribution to pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics. In: *Life sciences* 231, S. 116540. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.06.015.

Browning, Brian L.; Zhou, Ying; Browning, Sharon R. (2018): A One-Penny Imputed Genome from Next-Generation Reference Panels. In: *American journal of human genetics* 103 (3), S. 338–348. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.07.015.

Chen, J. D.; Evans, R. M. (1995): A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. In: *Nature* 377 (6548), S. 454–457. DOI: 10.1038/377454a0.

Distl, O. (1993): Analysis of pedigrees in dairy cattle segregating for bilateral strabismus with exophthalmus. In: *Journal of Animal Breeding and Genetics* 110, S. 393–400.

Distl, O.; Gerst, M. (2000): Association Analysis between Bilateral Convergent Strabismus with Exophthalmus and Milk Production Traits in Dairy Cattle. In: *J Vet Med Series A* 47 (1), S. 31–36. DOI: 10.1046/j.1439-0442.2000.00259.x.

Distl, O.; Wenninger, A.; Kräusslich, H. (1991): Inheritance of convergent strabismus with exophthalmus in cattle. In: *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 98, S. 354–356.

Fink, S.; Mömke, S.; Distl, O. (2012): PLXNC1 and RDH13 associated with bilateral convergent strabismus with exophthalmus in German Brown cattle 2012. In: *Molecular vision* 18, S. 2229–2240.

Flury, C.; Tapio, M.; Sonstegard, T.; Drögemüller, C.; Leeb, T.; Simianer, H. et al. (2010): Effective population size of an indigenous Swiss cattle breed estimated from linkage disequilibrium. In: *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift für Tierzucht und Zuchtungsbiologie* 127 (5), S. 339–347. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2010.00862.x.

Gelatt, Kirk N. (Hg.) (2014): Essentials of veterinary ophthalmology. Third edition. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/9781118910337>.

Gerst, M.; Distl, O. (1997): Einflüsse auf die Dissemination des bilateralen Strabismus convergens mit Exophthalmus beim Rind. In: *Archiv für Tierzucht* 40, S. 401–412.

Gibbs, Richard A.; Taylor, Jeremy F.; van Tassell, Curtis P.; Barendse, William; Eversole, Kellye A.; Gill, Clare A. et al. (2009): Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5926), S. 528–532. DOI: 10.1126/science.1167936.

Grewal, Gurpreet Kaur; Kukal, Samiksha; Kanojia, Neha; Saso, Luciano; Kukreti, Shrikant; Kukreti, Ritushree (2017): Effect of Oxidative Stress on ABC Transporters: Contribution to Epilepsy Pharmacoresistance. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (3). DOI: 10.3390/molecules22030365.

Hauke, G. (2003): Candidate gene analysis for bilateral convergent strabismus with exophthalmus in German Brown cattle. Inaugural-Dissertation. School of Veterinary Medicine Hannover, Hannover. Institute of Animal Breeding and Genetics.

Hayes, Ben J.; Daetwyler, Hans D. (2019): 1000 Bull Genomes Project to Map Simple and Complex Genetic Traits in Cattle. Applications and Outcomes. In: *Annual review of animal biosciences* 7, S. 89–102. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-115024.

Jepsen, Kristen; Solum, Derek; Zhou, Tianyuan; McEvelly, Robert J.; Kim, Hyun-Jung; Glass, Christopher K. et al. (2007): SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron. In: *Nature* 450 (7168), S. 415–419. DOI: 10.1038/nature06270.

Kim, Kyung Woo; Kusuhara, Sentaro; Katsuyama-Yoshikawa, Atsuko; Nobuyoshi, Sho; Kitamura, Megumi; Mori, Sotaro et al. (2021): Changes in Gene Expression Profiling and Phenotype in Aged Multidrug Resistance Protein 4-Deficient Mouse Retinas. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (3). DOI: 10.3390/antiox10030455.

Lytrivi, Maria; Senée, Valérie; Salpea, Paraskevi; Fantuzzi, Federica; Philippi, Anne; Abdulkarim, Baroj et al. (2021): DNAJC3 deficiency induces β -cell mitochondrial apoptosis and causes syndromic young-onset diabetes. In: *European journal of endocrinology* 184 (3), S. 455–468. DOI: 10.1530/EJE-20-0636.

Matsumiya, Wataru; Kusuhara, Sentaro; Hayashibe, Keiko; Maruyama, Kazuichi; Kusuhara, Hiroyuki; Tagami, Mizuki et al. (2012): Forskolin modifies retinal vascular development in Mrp4-knockout mice. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 53 (13), S. 8029–8035. DOI: 10.1167/iovs.12-10781.

McClelland, Collin; Manousakis, Georgios; Lee, Michael S. (2016): Progressive External Ophthalmoplegia. In: *Current neurology and neuroscience reports* 16 (6), S. 53. DOI: 10.1007/s11910-016-0652-7.

Mömke, S.; Fink, S.; Wöhlke, A.; Drögemüller, C.; Distl, O. (2008): Linkage of bilateral convergent strabismus with exophthalmus (BCSE) to BTA5 and BTA18 in German Brown cattle. In: *Animal genetics* 39 (5), S. 544–549. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2008.01771.x.

Mömke, Stefanie; Distl, Ottmar (2007): Bilateral convergent strabismus with exophthalmus (BCSE) in cattle. An overview of clinical signs and genetic traits. In: *Veterinary journal (London, England : 1997)* 173 (2), S. 272–277. DOI: 10.1016/j.tvjl.2005.11.020.

Mottis, Adrienne; Mouchiroud, Laurent; Auwerx, Johan (2013): Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. In: *Genes & development* 27 (8), S. 819–835. DOI: 10.1101/gad.214023.113.

Ozon, Z. Alev; Alikasifoglu, Ayfer; Kandemir, Nurgun; Aydin, Busra; Gonc, E. Nazli; Karaosmanoglu, Beren et al. (2020): Novel insights into diabetes mellitus due to DNAJC3-defect: Evolution of neurological and endocrine phenotype in the pediatric age group. In: *Pediatric diabetes* 21 (7), S. 1176–1182. DOI: 10.1111/pedi.13098.

Park, Dae Hwi; Hong, Sung Jun; Salinas, Ryan D.; Liu, Siyuan John; Sun, Shawn W.; Sgualdino, Jacopo et al. (2014): Activation of neuronal gene expression by the JMJD3 demethylase is required for postnatal and adult brain neurogenesis. In: *Cell reports* 8 (5), S. 1290–1299. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.060.

Phanstiell, D. H. (2021): Sushi: Tools for visualizing genomics data. Online verfügbar unter Dphansti@Stanford.Edu.

Purcell, Shaun; Neale, Benjamin; Todd-Brown, Kathe; Thomas, Lori; Ferreira, Manuel A. R.; Bender, David et al. (2007): PLINK. A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. In: *American journal of human genetics* 81 (3), S. 559–575. DOI: 10.1086/519795.

Qanbari, S.; Pimentel, E. C. G.; Tetens, J.; Thaller, G.; Lichtner, P.; Sharifi, A. R.; Simianer, H. (2010): The pattern of linkage disequilibrium in German Holstein cattle. In: *Animal genetics* 41 (4), S. 346–356. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2009.02011.x.

R Core Team (2020): R: A Language and Environment for Statistical Computing. Version 3.4.2.

Regan, W. M.; Gregory, P. W.; Mead, S. W. (1944): Hereditary strabismus in Jersey cattle. In: *The Journal of Heredity* 35 (8), S. 233–234.

Russel, Frans G. M.; Koenderink, Jan B.; Masereeuw, Rosalinde (2008): Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. In: *Trends in pharmacological sciences* 29 (4), S. 200–207. DOI: 10.1016/j.tips.2008.01.006.

Schooser, Benedikt G. H. (2007): Ocular myositis: diagnostic assessment, differential diagnoses, and therapy of a rare muscle disease - five new cases and review. In: *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 1 (1), S. 37–42.

Schütz-Hänke, W.; Stöber, M.; Drommer, W. (1979): Klinische, genealogische und pathomorphologische Untersuchungen an schwarzbunten Rindern mit beiderseitigem exophthalmisch-konvergierendem Schielen. In: *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 86, S. 185–191.

Sim, Ngak-Leng; Kumar, Prateek; Hu, Jing; Henikoff, Steven; Schneider, Georg; Ng, Pauline C. (2012): SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. In: *Nucleic acids research* 40 (Web Server issue), W452-7. DOI: 10.1093/nar/gks539.

Synofzik, Matthis; Haack, Tobias B.; Kopajtich, Robert; Gorza, Matteo; Rapaport, Doron; Greiner, Markus et al. (2014): Absence of BiP co-chaperone DNAJC3 causes diabetes mellitus and multisystemic neurodegeneration. In: *American journal of human genetics* 95 (6), S. 689–697. DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.10.013.

Tsai, Chih-Cheng; Kao, Hung-Ying; Mitzutani, Akifumi; Banayo, Ester; Rajan, Harini; McKeown, Michael; Evans, Ronald M. (2004): Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (12), S. 4047–4052. DOI: 10.1073/pnas.0400615101.

van Binsbergen, Rianne; Bink, Marco Cam; Calus, Mario Pl; van Eeuwijk, Fred A.; Hayes, Ben J.; Hulsegge, Ina; Veerkamp, Roel F. (2014): Accuracy of imputation to whole-genome sequence data in Holstein Friesian cattle. In: *Genetics, selection, evolution : GSE* 46, S. 41. DOI: 10.1186/1297-9686-46-41.

Visuttijai, Kittichate; Hedberg-Oldfors, Carola; Lindgren, Ulrika; Nordström, Sara; Elíasdóttir, Ólöf; Lindberg, Christopher; Oldfors, Anders (2021): Progressive external ophthalmoplegia associated with novel MT-TN mutations. In: *Acta neurologica Scandinavica* 143 (1), S. 103–108. DOI: 10.1111/ane.13339.

Vogt, C. (2000): Untersuchungen zum bilateralen Strabismus convergens mit Exophthalmus (BCSE) beim Deutschen Braunvieh. Inaugural-Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover. Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Zoghbi, H. Y.; Orr, H. T. (2000): Glutamine repeats and neurodegeneration. In: *Annual review of neuroscience* 23, S. 217–247. DOI: 10.1146/annurev.neuro.23.1.217.

2.6 Allgemeine Diskussion BCSE

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die genetische Architektur der Erkrankung BCSE bei Tieren der Rasse Holstein-Rind zu verstehen und beteiligte Genomregionen zu identifizieren. Bisher konnte keine kausale Genvariante für die Entstehung der Erkrankung, weder bei Tieren der Rasse Holstein noch der Rasse Braunvieh, gefunden werden.

Eine vorangegangene Assoziationsstudie, durchgeführt an Tieren der Rasse Braunvieh, unterstützte insgesamt zwei Gene auf BTA 5 und BTA 18, die bei der Entstehung der Erkrankung eine Rolle spielen könnten (Fink et al. 2012). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte genomweite Assoziationsstudie basierend auf 54.223 SNP-Markern in einer Gruppe von insgesamt 89 Tieren, davon 29 an BCSE erkrankten und 60 nicht erkrankten Kontrolltieren, der Rasse Braunvieh konnte diese Ergebnisse nicht bestätigen. Anhand der Daten konnten keine signifikant mit dem Auftreten von BCSE assoziierten Bereiche identifiziert werden. Auch die an Tieren der Rasse Holstein-Rind durchgeführte GWAS auf einer Datengrundlage nach Imputation konnte keine signifikant assoziierten Bereiche auf BTA 5 und 18 nachweisen. Es ist möglich, dass die Ursache der Erkrankung in den verschiedenen Rassen unterschiedlichen genetischen Ursprungs ist. Weitere Untersuchungen betroffener Tiere unterschiedlicher Rassen könnten Bestandteil zukünftiger Studien sein. Eine GWAS an Tieren der Rasse Braunvieh nach Erhöhung der genutzten Markerdichte durch Imputation auf Sequenzebene könnte einen Vergleich der Rassen in Bezug auf mögliche mit dem Auftreten von BCSE assoziierte Bereiche zulassen.

Der klinische Phänotyp der Erkrankung BCSE wurde in der Vergangenheit genau beschrieben (Schütz-Hänke et al. 1979; Mömke und Distl 2007), die Auswahl der in die vorliegenden Untersuchungen einfließenden betroffenen Tiere wurde auf dieser Grundlage festgelegt. Alle als betroffen eingestuft Tiere wiesen ein bilaterales Auftreten der Erkrankung sowie ein simultanes Auftreten von konvergierendem Strabismus und Exophthalmus auf. Das Alter der Erstmanifestation lag bei allen Tieren der Rasse Holstein-Rind über sechs Monaten, bei den für die GWAS genutzten Tieren der Rasse Braunvieh konnten keine Angaben über das Alter der Erstmanifestation gemacht werden. Da die Erkrankung in der Regel nicht vor einem Alter von mindestens sechs Monaten auftritt, könnte hier das Vorliegen einer anderen, nicht progressiv verlaufenden Erkrankung mit einhergehender Fehlstellung der Augen von Geburt an gegen das Vorliegen von BCSE sprechen. Eine sehr genaue Dokumentation des klinischen

Phänotyps, des Alters der Erstmanifestation und des Verlaufes der Erkrankung wäre ideal und wünschenswert für die Auswahl betroffener Tiere, deren Daten in etwaige Untersuchungen eingehen könnten. Da in vielen Fällen erste Anzeichen der Erkrankung erst im fortgeschrittenen Alter der Tiere sichtbar werden (Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991; Distl 1993; Distl und Gerst 2000), sollte auch das Alter der als Kontrolle genutzten Tiere möglichst hoch gewählt werden, um ein Auftreten der Erkrankung im weiteren Verlauf des Lebens weitestgehend auszuschließen.

Eine frühere durchgeführte neuropathologische Untersuchung des *Nervus abducens* betroffener Tiere zeigte eine signifikant verringerte Anzahl an Nervenzellen in der Kernregion dieses Nerven. Dieser Befund lässt auf eine motorische Insuffizienz der innervierten Augenmuskeln schließen (Schütz-Hänke et al. 1979; Witt 2007) und könnte darauf hinweisen, dass es sich bei der Entstehung von BCSE um einen neurodegenerativen Prozess handelt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte histopathologische Untersuchung der sieben, an der Bewegung des Augapfels beteiligten, quergestreiften intraorbitalen Muskeln an zwei betroffenen Tieren zeigte Anzeichen von degenerativen und entzündlichen Prozessen. Aufgrund des angulären Erscheinungsbildes ist eine mögliche Ursache der beobachteten Atrophie ein neurogenes Problem der innervierenden Nerven. Die neuropathologische Untersuchung der entsprechenden Nerven und Hirnareale zeigten allerdings keinerlei morphologische Veränderungen. Hierbei muss beachtet werden, dass nur ein einziges betroffenes Tier neuropathologisch untersucht wurde. Die durchgeführte GWAS an Tieren der Rasse Holstein-Rind basierend auf einer Datengrundlage nach Imputation auf Sequenzebene zeigte signifikant mit dem Auftreten von BCSE assoziierte SNPs lokalisiert auf den Chromosomen 2, 12 und 17. Die assoziierten SNPs liegen innerhalb des Gens *ABCC4* sowie angrenzend an die Gene *NCOR2* und *DNAJC3*. *NCOR2* ist in verschiedene biologische Prozesse involviert, die in einigen Fällen mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können (Zoghbi und Orr 2000; Tsai et al. 2004; Burchfield et al. 2015). Eine Beteiligung dieses Gens an der Entstehung von BCSE bei Tieren der Rasse Holstein-Rind hätte daher auf pathologische Veränderungen der entsprechenden Nerven und Hirnareale schließen lassen können. Weitere Untersuchungen des Gens, zum Beispiel in einem Kandidatengenansatz, in dem codierende und regulatorische Bereiche des Gens sequenziert und untersucht werden sowie neuropathologische Untersuchungen weiterer betroffener Tiere könnten die Rolle von *NCOR2* in der Entstehung von BCSE aufklären. Auch das Gen *DNAJC3* konnte bereits mit

neurodegenerativen Prozessen in Verbindung gebracht werden (Ozon et al. 2020) und weitere Untersuchungen wären nötig um eine Beteiligung an der Entstehung und Entwicklung des BCSE des Holstein-Rindes zu klären.

Histopathologische und histochemische Untersuchungen einer vorangegangenen Studie des *Musculus rectus lateralis* und des *Musculus rectus medialis* betroffener Tiere zeigten so genannte Ragged-Red-Fibers (RRF) (Vogt 2000). Dieser Befund könnte auf das Vorliegen einer Störung der mitochondrialen Atmungskette hinweisen. Die zur Darstellung dieser RRF benötigte Gomöri-Trichom-Färbung konnte in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten histopathologischen Untersuchung nicht gemacht werden. Ein mögliches Vorliegen einer Störung der mitochondrialen Atmungskette kann also nicht ausgeschlossen, aber auch nicht angenommen werden. Das klinische Erscheinungsbild und die genetischen Grundlagen mitochondrialer Erkrankungen sind sehr vielfältig und durch eine große Genotyp-Phänotyp-Variabilität gekennzeichnet. Ursachen mitochondrialer Funktionsstörungen können dabei Mutationen nukleärer Gene, aber auch Mutationen der mtDNA sein (Kornblum et al. 2004). Könnten in histopathologischen und histochemischen Untersuchungen betroffener Tiere Hinweise auf eine Störung der mitochondrialen Atmungskette gefunden werden, wären zukünftige Untersuchungen der mtDNA dieser Tiere sinnvoll. Analysen der mtDNA könnten eventuell Rückschlüsse auf den Modus der Vererbung geben.

Die durchgeführte Kandidatengenanalyse des Gens *SPG7* konnte keinerlei strukturelle Variation innerhalb der codierenden Bereiche des Gens nachweisen. Mutationen des Gens *SPG7* stehen in Verbindung mit der Erkrankung PEO des Menschen, einer mitochondrialen Enzephalomyopathie, die symptomatische Übereinstimmungen mit BCSE zeigt. Da nur die codierenden Bereiche des Gens sequenziert und untersucht wurden, kann eine Beteiligung regulatorischer Bereiche des Gens allerdings nicht ausgeschlossen werden. Gegen die Beteiligung von *SPG7* an der Entstehung von BCSE spricht hingegen das Ergebnis der GWAS auf der Datengrundlage nach Imputation, da keine signifikant assoziierten SNPs auf BTA 18 gefunden wurden.

Ziel zukünftiger Studien sollte sein, die genauen Hintergründe der Erkrankung zu erforschen und zu verstehen. Histopathologische und histochemische Untersuchungen der Augenmuskeln sowie der entsprechenden Nerven und Hirnareale betroffener Tiere könnten Rückschlüsse auf die Entstehung und Ursache der Erkrankung geben. Auch könnte auf diese

Weise aufgeklärt werden, ob es sich möglicherweise um unterschiedliche pathologische Prozesse verschiedenen Ursprungs handelt, die zum klinischen Phänotyp BCSE führen. Des Weiteren könnte eine klinische Ganzkörperuntersuchung betroffener Tiere sinnvoll sein. Betroffene Tiere entwickeln einen unsicheren Gang, der gegebenenfalls für eine Myopathie sprechen könnte. Im Fall des Vorliegens einer Störung der mitochondrialen Atmungskette könnten histopathologische Untersuchungen anderer Muskelgruppen Aufschluss darüber geben, ob sich die Erkrankung BCSE tatsächlich nur auf die Muskulatur der Augen beschränkt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Entstehung des BCSE genetisch komplex zu sein scheint und kein kausales Einzelgen diese Erkrankung bedingt. Die Entwicklung eines genetischen Tests zur Identifikation von Merkmalsträgern ist damit zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

2.7 Zusammenfassung

Der bovine bilaterale konvergente Strabismus mit Exophthalmus (BCSE) ist eine seit langem bekannte, progressiv verlaufende Erkrankung, einhergehend mit einem beidseitigen konvergierenden Schielen in Verbindung mit einem Hervortreten der Augen aus der Augenhöhle. Die Erkrankung wurde bereits in verschiedenen Rassen beschrieben. In ihrem Verlauf kann BCSE zur völligen Erblindung der Tiere führen. Die sich einstellende Einschränkung der Sehfähigkeit führt zu Auffälligkeiten im Verhalten der Tiere und hat häufig einen frühzeitigen Abgang der betroffenen Tiere aus der Herde zur Folge (Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991; Gerst und Distl 1997; Distl und Gerst 2000). Verschiedene in der Vergangenheit verfolgte Ansätze mit dem Ziel, die Ursachen der Erkrankung und den Modus der Vererbung zu verstehen, konnten bisher keine kausale Genvariante identifizieren. Vorgegangene Studien, welche die zugrunde liegenden genetischen Ursachen der Erkrankung untersuchten, wurden bisher allerdings nur an Tieren der Rasse Braunvieh durchgeführt (Distl et al. 1991; Distl und Gerst 2000; Hauke 2003; Mömke 2004; Mömke et al. 2008). Ziel dieser Arbeit war es, die genetische Architektur der Erkrankung bei Tieren der Rasse Holstein-Rind zu verstehen und beteiligte Genomregionen zu identifizieren. Die Identifikation der kausalen Genvariante könnte die Entwicklung eines geeigneten genetischen Tests ermöglichen, der den Ausschluss von Merkmalsträgern aus der Zuchtpopulation gewährleistet und somit die Frequenz des Auftretens der Erkrankung senken könnte. Die durchgeführte GWAS an Tieren der Rasse Braunvieh mit dem Ziel Ergebnisse vorangegangener Studien zu reproduzieren, oder aber andere möglicherweise beteiligte Genomregionen für diese Rasse zu bestimmen, konnte keine signifikant mit dem Auftreten von BCSE assoziierten Bereiche identifizieren. Eine Kandidatengenanalyse des Gens *SPG7* auf BTA 18 an einer Stichprobe von Tieren der Rasse Holstein-Rind zeigte keinerlei strukturelle Veränderungen des Gens in den codierenden Bereichen. Die Beteiligung der regulatorischen Bereiche kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da diese nicht untersucht wurden. Gegen den Einfluss von *SPG7* auf die Entstehung von BCSE bei Tieren der Rasse Holstein-Rind sprechen die Ergebnisse der durchgeführten GWAS an Tieren der Rasse Holstein-Rind auf Basis einer Datengrundlage nach Imputation. Die GWAS zeigte signifikant mit dem Auftreten von BCSE assoziierte SNPs auf BTA 2, 12 und 17, nicht auf BTA 18. Signifikant assoziierte Varianten liegen innerhalb des Gens *ABCC4* auf BTA 12 sowie angrenzend an die Gene *NCOR2* auf BTA 17 und *DNAJC3* auf BTA 12. *NCOR2* ist in verschiedene biologische Prozesse involviert, die in

einigen Fällen mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten (Zoghbi und Orr 2000; Tsai et al. 2004; Burchfield et al. 2015). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten histopathologischen Untersuchungen der Augenmuskeln zweier an BCSE erkrankter Rinder zeigten, dass neurodegenerative Prozesse eine Ursache für die Entstehung von BCSE sein könnten. Die neuropathologische Untersuchung der entsprechenden Nerven und Hirnareale an einem betroffenen Tier konnte allerdings keine morphologischen Veränderungen nachweisen. Weitere histopathologische und neuropathologische Untersuchungen betroffener Tiere sind notwendig, um zu klären, ob es sich bei der Erkrankung BCSE um eine neurodegenerative Erkrankung handelt. Auch wären weitere Untersuchungen des Gens *NCOR2* an Daten betroffener Tiere notwendig, um die mögliche Beteiligung dieses Gens an der Entstehung von BCSE zu klären. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Entstehung von BCSE bei Rindern der Rasse Holstein-Rind nicht auf ein kausales Einzelgen zurückzuführen ist. Es scheint sich um ein genetisch komplexes Geschehen zu handeln, an dem mehr als ein Gen und auch regulatorische Bereiche beteiligt sein könnten. Die angestrebte Entwicklung eines möglichen genetischen Tests mit dem Ziel potentielle Merkmalsträger aus der Zuchtpopulation auszuschließen ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich und im Fall eines genetisch sehr komplexen Geschehens auch zukünftig wahrscheinlich schwer zu realisieren.

2.8 Summary

Bovine bilateral convergent strabismus with exophthalmos (BCSE) is a long known progressive disease, associated with bilateral convergent strabismus combined with protrusion of the eyeball from the orbit. The disease has been described in different breeds. In its development, BCSE may lead to complete blindness of the affected animals. The resulting reduction in visual acuity leads to abnormal behavior and often results in the early departure of the affected animals from the herd (Regan et al. 1944; Schütz-Hänke et al. 1979; Distl et al. 1991; Gerst and Distl 1997; Distl and Gerst 2000). Various approaches pursued in the past with the aim of understanding the causes of the disease and the mode of inheritance have so far been unable to identify a causal gene variant. However, in those previous studies only German Brown cattle have been taken into account (Distl et al. 1991; Distl and Gerst 2000; Hauke 2003; Mömke 2004; Mömke et al. 2008). The aim of this study was to understand the genetic architecture of the disease in Holstein cattle and to identify involved genome regions. The identification of the underlying causal gene variant could enable the development of a suitable genetic test that may ensure the exclusion of potential carriers of the disease from the breeding population. By this, the frequency of occurrence of the disease could be reduced. The GWAS performed on Brown cattle with the aim to reproduce the results of previous studies or to identify other possibly involved genome regions for this breed could not identify any with the occurrence of BCSE significantly associated areas. A candidate gene approach of the gene *SPG7* on BTA 18 in a sample of Holstein cattle showed no structural changes of the gene in its coding regions. However, the involvement of the regulatory areas cannot be excluded, as these were not investigated. The results of the GWAS in a sample of Holstein cattle after imputation to sequence level also speak against the involvement of *SPG7* in the development of BCSE, as the GWAS only showed SNPs significantly associated with the occurrence of BCSE on BTA 2, 12 and 17, not on BTA 18. The significantly associated SNPs are located within the gene *ABCC4* as well as adjacent to the *NCOR2* and *DNAJC3* genes. *NCOR2* is involved in various biological processes, which in some cases have been associated with neurodegenerative diseases (Zoghbi und Orr 2000; Tsai et al. 2004; Burchfield et al. 2015). Histopathological examinations of the eye muscles of two cattle suffering from BCSE in the context of this work showed that neurodegenerative processes could be a cause for the development of BCSE. However, the neuropathological examination of the corresponding nerves and brain areas in an affected animal could not detect any morphological changes. Further histopathological and

neuropathological examinations of affected animals are necessary to clarify whether BCSE is a neurodegenerative disease. Further investigation of the *NCOR2* gene in data from affected animals would also be necessary to clarify the possible involvement of this gene in the development of BCSE. The results of the present studies indicate that the development of BCSE in Holstein cattle is not due to a single causal gene. It appears to be a genetically complex event in which more than one gene and also regulatory regions could be involved. The intended development of a possible genetic test with the aim of excluding potential trait carriers from the breeding population is not possible at this point in time and, in the case of a genetically very complex event, probably even difficult to realize in the future.

3 Genetische Analyse der equinen hereditären Mikrophthalmie

3.1 Einführung

Kongenital auftretende Erkrankungen der Augen kommen bei Pferden eher selten vor und spielen daher im Allgemeinen keine große wirtschaftliche Rolle in der Pferdezucht (Latimer et al. 1983; Gilger 2011). Bedingen diese Erkrankungen jedoch eine eingeschränkte Sehfähigkeit oder stellen eine ästhetische Beeinträchtigung dar, sind sie für das weitere Leben der Tiere und damit auch aus wirtschaftlicher Sicht für den Züchter oder Besitzer von großer Relevanz. Natürlich müssen hier auch die Einschränkungen und ein eventuell daraus resultierendes Leiden für das Tier selbst mit betrachtet werden. Bei der equinen Mikrophthalmie handelt es sich um eine kongenitale Erkrankung, die zum einen die Sehfähigkeit des betroffenen Auges stark beeinflussen kann und zum anderen eine erhebliche ästhetische Auswirkung auf das jeweilige Tier hat. Betroffene Pferde sind damit nicht uneingeschränkt zu vermarkten und häufig nicht in der ihnen zgedachten Weise zu nutzen. Mikrophthalmie ist die am häufigsten auftretende kongenitale Augenerkrankung bei Pferden (Roberts 1992). Eine Erblichkeit der equinen Mikrophthalmie wird vermutet, bisher ist ein möglicher Erbgang und die zugrunde liegende genetische Disposition allerdings unbekannt (Gilger 2011). Im Jahr 2011 kam es innerhalb des ersten Fohlenjahrganges eines Hengstes des Holsteiner Verbandes zu einer ungewöhnlich hohen Anzahl mikrophthalmischer Nachkommen auf verschiedenen Betrieben, so dass innerhalb dieser Familienstruktur von einer möglichen Erblichkeit dieser Erkrankung ausgegangen werden musste.

Das Ziel dieser Untersuchung ist es, kausal beteiligte Genvarianten zu identifizieren, den möglichen Vererbungsweg verstehen und nachvollziehen zu können und die Entwicklung genetischer Testverfahren zu ermöglichen. Genetische Tests könnten in Zukunft genutzt werden, um mögliche Risikoanpaarungen zu vermeiden und die Frequenz des Auftretens der equinen Mikrophthalmie zu verringern.

3.2 Auftreten equiner Mikrophthalmie innerhalb des ersten und zweiten Fohlenjahrgangs eines jungen Holsteiner Verbandshengstes

Ein junger Hengst des Holsteiner Verbandes fiel 2011 mit seinem ersten Fohlenjahrgang durch eine ungewöhnlich hohe Anzahl an von Mikrophthalmie betroffener Nachkommen auf (Abb.4). In 2011 wurden rund 80 Fohlen des Hengstes geboren, von denen mindestens 10 einen Mikrophthalmiephänotyp variabler Ausprägung zeigten. Auf Grundlage dieser Beobachtung wurde der Hengst aus der Besamung genommen und im Jahr 2012 wurden nur wenige Fohlen des Hengstes geboren, doch auch in diesem Jahrgang wurde ein betroffener Nachkomme verzeichnet. Alle von Mikrophthalmie betroffenen Fohlen kamen auf unterschiedlichen Betrieben, in verschiedenen Regionen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Welt. Des Weiteren konnten andere Fälle mikrophthalmischer Pferde innerhalb der Familienstruktur des betreffenden Hengstes gefunden werden. Auf Grundlage dieser Beobachtungen kann im vorliegenden Fall davon ausgegangen werden, dass es sich um eine erbliche Form der equinen Mikrophthalmie innerhalb dieser Familienstruktur handelt.



Abbildung 4: Mikrophthalmisches Holsteiner Fohlen (Fotos: J. Tetens).

Einseitig betroffen, deutlicher Unterschied in der Entwicklung der Augen bedingt eine Asymmetrie des Gesichtsschädels (linke Abb. linkes Auge; rechte Abb. rechtes Auge).

3.3 Literaturübersicht

3.3.1 Holsteiner Verband

Gegründet 1935 als „Verband der Züchter des Holsteiner Pferdes“ zählt der Holsteiner Verband heute zu den erfolgreichsten Sportpferdezuchtverbänden weltweit. Speziell in der Zucht erfolgreicher Springpferde liegt der Holsteiner Verband weit vorne im weltweiten Vergleich, wie die jährlich veröffentlichten Rankings der World Breeding Federation for Sport Horses (WBFSH) belegen. Die Rasse des Holsteiner Pferdes wurde über Jahrhunderte in bäuerlicher Zucht betrieben, deren Ursprung in den Flussmarschen der Elbe und an der Westküste Schleswig-Holsteins liegt. Bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts lag das Zuchtziel in einem Wirtschaftspferd, dem auch durch die gezielte Zufuhr von Vollblutanteilen Ausdrucksstärke, Rahmen, Körpersubstanz und ein starker Knochenbau eigen waren (Verband der Züchter des Holsteiner Pferdes e.V. 2019). Mit der Motorisierung der Landwirtschaft nach dem 2. Weltkrieg verlor das Wirtschaftspferd stark an Bedeutung und die Pferdebestände sanken rapide. Mit dem Ziel, den Typ des Wirtschaftspferdes den darauffolgenden Marktansprüchen anzupassen, war eine Änderung zum modernen Reitpferd notwendig. Diese Veredelung und die Umzüchtung vom Wirtschaftspferd zum Sportpferd wurde vorrangig durch den Einsatz englischer Vollbluthengste erzielt (Thiedemann um 1989; Verband der Züchter des Holsteiner Pferdes e.V. 2019). Der vermehrte Einsatz von Vollbluthengsten in der Zucht ist heute auch aus dem Grund von Bedeutung, dass Erkrankungen wie die equine Mikrophthalmie bei Vollblütern eine höhere Inzidenz zu haben scheinen als in anderen Rassen und Erkrankungen möglicherweise über Vollblutanteile in die Population der Warmblutpferde gelangt sein könnten (Roberts 1992; Gilger 2011). Die heutige Zuchtmethode entspricht grundsätzlich der Methodik der Reinzucht, es werden vorrangig Holsteiner Hengste und Stuten eingesetzt. Die Hereinnahme von Zuchtmaterial aus anderen Populationen ist jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen. Eine Pedigree Analyse auf der Grundlage von 123.923 Holsteiner Warmblutpferden zeigte, dass die sehr starke Nutzung einiger weniger Hengstlinien in der jüngeren Vergangenheit zu einem Verlust genetischer Diversität geführt hat. Die effektive Populationsgröße wurde auf 55,3 Tiere geschätzt, wobei 50% der genetischen Variabilität auf 11 wichtige Ahnen zurückzuführen sind. Dennoch konnte in der letzten untersuchten Generation wieder ein leichter Anstieg der effektiven Populationsgröße gezeigt werden und auch eine Stagnation der Inzuchtrate war festzustellen (2,27%). Die

Autoren führten diese Beobachtung auf eine Änderung der Zuchtpolitik in der Holsteiner Pferdezucht, hin zu einer Öffnung des Zuchtprogrammes für Hengste anderer Herkunft (Roos et al. 2015).

3.3.2 Mikrophthalmie

Die Mikrophthalmie, oder Kleinäugigkeit, beschreibt eine ophthalmologische, neonatal auftretende Erkrankung, bei der es zu einer unilateralen oder auch bilateralen Verkleinerung der Augäpfel kommt. Für den Menschen wurde ein Klassifikationsschema etabliert, nach dem Mikrophthalmie vorliegt, wenn der betroffene Augapfel in seiner Axiallänge mindestens 2 Standardabweichungen unterhalb der Norm für das jeweilige Alter liegt (Bardakjian et al. 1993). Bei einem Vorliegen von Mikrophthalmie sind jedoch immer okuläre Strukturen innerhalb der Orbita nachweisbar, im Fall schwerwiegender Mikrophthalmie können diese mit Hilfe von histopathologischen Untersuchungen, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie dargestellt werden. Das Fehlen jeglicher Augenanlagen wird als Anophthalmie bezeichnet. Ein strukturell unauffälliger, lediglich leicht verkleinerter Augapfel wird als Nanophthalmus bezeichnet (Bardakjian et al. 1993; Verma und Fitzpatrick 2007). Anophthalmie und Mikrophthalmie können in isolierter Form auftreten oder auch als Teil eines Syndroms. Isolierte und nicht einem Syndrom zuzuordnende Mikrophthalmie tritt bei Menschen selten in Erscheinung, in den meisten Fällen liegen weitere Anomalien des Augapfels vor, in diesem Fall wird häufig auch von komplexer Mikrophthalmie gesprochen (Verma und Fitzpatrick 2007; Richardson et al. 2017). Die Sehfähigkeit kann je nach Schweregrad der Mikrophthalmie uneingeschränkt oder reduziert sein. Bei einer starken Ausprägung, einhergehend mit verschiedenen Fehlbildungen des Auges, kann eine völlige Blindheit des betreffenden Auges bestehen (Gelatt 2014; Verma und Fitzpatrick 2007). In der englischen Bevölkerung lag die Gesamtprävalenz für das Auftreten von Anophthalmie und Mikrophthalmie im Zeitraum von 1988-1994 bei 1 pro 10.000 Geburten (Dolk et al. 1998).

Die Augenentwicklung ist ein hochkomplexer Prozess, der bereits früh in der embryonalen Entwicklung beginnt. Mutationen, die zu klinisch relevanten Phänotypen, wie Anophthalmie

und Mikrophthalmie führen, könnten Gene betreffen, die an der Spitze der regulatorischen Hierarchie stehen und daher am Beginn der Augenentwicklung wirken (Graw 2003).

Mikrophthalmie und Anophthalmie wurden bereits in verschiedenen Spezies beschrieben. Die OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals) Datenbank (<http://omia.angis.org.au>) verzeichnet Informationen zum Auftreten von Mikrophthalmie bei Hühnern sowie in acht verschiedenen Säugetierspezies. Die Erkrankung wurde zum Beispiel in verschiedenen Hunderassen, wie dem Zwergschnauzer und dem Australien Shepherd beschrieben (Shastry und Reddy 1994; Gelatt und McGill 1973). Eine Aminosäure Deletion nahe des N-Terminus des Retinol-Bindungsprotein 4 (*RBP4*) konnte für den Irish Soft Coated Wheaten Terrier als ursächlich für das Auftreten einer kongenitalen Malformation der Augen, welche der Mikrophthalmie gleicht, ausfindig gemacht werden (Kaukonen et al. 2018). In einer Familienstruktur der Hunderasse Golden Retriever konnten angeborene, verschiedenartige Fehlbildungen der Augen mit einer Mutation des *SIX6* Gens in Verbindung gebracht werden (Hug et al. 2019). Bilateral und unilateral auftretende Anophthalmie sowie Mikrophthalmie wurden in verschiedenen Rinderrassen beschrieben. In manchen Fällen zeigten betroffene Kälber weitere Fehlbildungen, im Besonderen im kaudalen Bereich der Wirbelsäule einschließlich des Auftretens einer Schwanzlosigkeit (Leipold und Huston 1968). Im Fall eines mikrophthalmischen Holstein Kalbes, welches keinerlei Pigmentierung von Haut und Haaren, sowie eine anscheinende Beeinträchtigung des Knochenwachstums aufwies, konnte eine heterozygote Deletion des gesamten *MITF* Gens als wahrscheinlich ursächlich bestimmt werden (Wiedemar und Drögemüller 2014). Eine Punktmutation des *PITX3* Gens konnte bei Texel Schafen als ursächlich für das Auftreten identifiziert werden (Becker et al. 2010). Bei Hühnern wurden Anophthalmie und Mikrophthalmie als erbliche und möglicherweise durch das Geschlecht beeinflusste Erkrankungen beschrieben. Die Mikrophthalmie tritt vorwiegend beidseitig auf (Somes 1992) und wird als sporadisch auftretende Fehlbildung mit variabler Ausprägung wobei das linke Auge häufig stärker betroffen ist beschrieben (Ehrlich et al. 1989). In der OMIA Datenbank (<http://omia.angis.org.au>) finden sich des Weiteren Informationen zum Auftreten der Mikrophthalmie bei Hausschweinen, Wasserbüffeln, Rothirschen, Campbell-Zwerghamstern, sowie Goldhamstern. Außerdem wurde Mikrophthalmie in Katzen, Frettchen, Mäusen, Ratten und Reptilien beschrieben (Gelatt 2014).

Das Auftreten der Mikrophthalmie kann in einigen Fällen mit Veränderungen im Erbgut des betroffenen Individuums in Verbindung gebracht werden, es sind jedoch auch verschiedene Umweltfaktoren bekannt, die Fehlbildungen der Augen zur Folge haben können. Bei Menschen können pränatale Infektionen, zum Beispiel mit dem *Rubella virus* oder *Toxoplasma gondii* zu mikrophthalmischen Föten führen, sowie die Ingestion teratogener Substanzen oder ein Drogenmissbrauch der Mutter in der frühen Schwangerschaft. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Strahlung, Fieber und Hyperthermie eine teratogene Wirkung haben und zu Fehlbildungen der Augen führen können. Weitere mögliche Faktoren, die mikrophthalmische Föten zur Folge haben könnten, sind *Diabetes mellitus* sowie ein Vitamin A Mangel der Mutter (Dolk et al. 1998; Verma und Fitzpatrick 2007; Warburg 2009).

3.3.2.1 Equine Mikrophthalmie

Die Häufigkeit kongenital auftretender Augenerkrankungen bei Pferden wird als gering angesehen (Latimer et al. 1983). Equine Mikrophthalmie wurde bereits für verschiedene Pferderassen beschrieben, wobei Vollblüter eine höhere Inzidenz für diese Erkrankung zu zeigen scheinen (Dziezyc et al. 1983; Mosier et al. 1983; Roberts 1992; Gilger 2011). Medizinische Daten, erhoben am Colorado State University-Veterinary Teaching Hospital, belegen, dass 5,3% der gestellten Diagnosen an Pferden mit okulären Problemen kongenitale Defekte darstellen. Mikrophthalmie ist dabei mit 7,1%, eine der häufigsten gestellten Diagnosen aller kongenital auftretenden Augendefekte des Pferdes (Roberts 1992). Die Störung der Embryogenese zu einem frühen Zeitpunkt führt zu einer großen morphologischen Variabilität des Defektes, was in verschiedenen Fällen beschrieben werden konnte (Mosier et al. 1983). Die Equine Mikrophthalmie tritt unilateral oder bilateral auf, der Schweregrad der Ausprägung variiert von einem einfachen Mikrophthalmus (Nanophthalmus), gekennzeichnet durch eine leichte Verkleinerung des Augapfels, bis hin zu einer massiven Reduktion der Größe des betroffenen Augapfels in Verbindung mit diversen weiteren Malformationen. Unilateral betroffene Tiere sind in der Lage sich an die Situation zu adaptieren. In ihrem Sehvermögen stark eingeschränkte oder blinde Tiere, resultierend aus einem bilateralen Auftreten der Erkrankung, müssen in der Regel euthanasiert werden, da eine tiergerechte, sichere Haltung nur sehr schwer und nicht in jedem Fall möglich ist (Gilger 2011; Roberts 1992; Mosier et al.

1983). Die equine Mikrophthalmie wird in ihrem Auftreten in der Regel als sporadisch und idiopathisch beschrieben, in manchen Fällen wurden Intoxikationen während der Trächtigkeit als mögliche Ursache beschrieben (Dziezyc et al. 1983; Schutte und van den Ingh 1997). Bis zu diesem Zeitpunkt gibt es keine Assoziation zu einer im Erbgut manifestierten Veränderung als Ursache für die equine Mikrophthalmie, dennoch wird eine Erbllichkeit vermutet, der eventuell zugrunde liegende Erbgang ist jedoch noch völlig unklar (Roberts 1992; Gilger 2011).

3.3.3 Embryonale Entwicklung des Auges bei Vertebraten

Die Entwicklung des Auges ist ein komplexer Prozess, welcher bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Embryogenese seinen Anfang nimmt. Die verschiedenen Bestandteile des Auges entwickeln sich dabei aus unterschiedlichen Keimblättern. Die *Retina*, der *Nervus opticus* und der Glaskörper entstehen durch Ausstülpung des Diencephalons (Zwischenhirns) aus dem Neuroektoderm. Die Linse, das Hornhautepithel, die Lidrösen und der Tränenapparat bilden sich aus dem Ektoderm. Alle weiteren Bestandteile des Auges sind mesodermaler Herkunft. Dazu zählen zum Beispiel, die *Chorioidea*, die *Sklera* und der *Musculus ciliares* (Schnorr und Kressin 2006). Das Auge ist im Wesentlichen eine hoch spezialisierte Extension des Gehirns, erstes morphologisches Anzeichen der Augenentwicklung ist die bilaterale Ausstülpung des Diencephalons im Stadium der frühen Neurula (Graw 2003; Chow und Lang 2001).

Bildung der Augenbecher sowie der Linsenbläschen und die Entstehung der Augenspalte

Die paarig angelegten Augengruben werden als Ausstülpungen beidseitig des Prosencephalons (Vorderhirns) sichtbar, die weitere Entwicklung der Augengrube zur Augenblase vollzieht sich simultan zur Schließung des Neuralrohrs (Gelatt 2014; Schnorr und Kressin 2006). Die entstandene Augenblase wächst gegen das Oberflächenektoderm und induziert dort die Linsenanlage. Das Oberflächenektoderm formt in Kontakt mit der Augenblase die Linsenplakode. Durch Einstülpung der Linsenplakode in das darunter liegende Neuroektoderm faltet sich dieses auf und bildet das innere und äußere Blatt des entstehenden Augenbechers. Die Linsenplakode senkt sich dabei zur Linsengrube ein und schnürt sich als Linsenbläschen von der Epidermis ab. (Gelatt 2014; Schnorr und Kressin 2006). Das mehrschichtige, innere zum Linsenbläschen gerichtete Blatt des Augenbechers entwickelt sich

weiter zur *Retina*, das einschichtige, äußere Blatt des Augenbechers zum Pigmentblatt (Schnorr und Kressin 2006; Chow und Lang 2001). Durch den fortlaufenden Prozess der Invagination von der Augenblase zum Augenbecher wird der untere Rand zur Becherspalte eingestülpt, welche sich als Stielrinne auf den Augenbecherstiel fortsetzt. In die so entstandene Struktur der fetalen Augenspalte senkt sich mesenchymales Gewebe ein aus dem sich die *Arteria hyaloidea* bildet, welche über den Augenbecherstiel zur sich entwickelnden Linse verläuft (Abb. 5). Nach dem Schluss der fetalen Augenspalte durch Vereinigung deren Ränder wird der Augenbecherstiel zu einem doppelwandigen Rohr, welches als Leitbahn für die auswachsenden Nervenfortsätze der *Retina* zum Zwischenhirn und für die sich entwickelnde *Arteria centralis retinae* dient (Chow und Lang 2001; Gelatt und McGill 1973; Schnorr und Kressin 2006; Gelatt 2014).

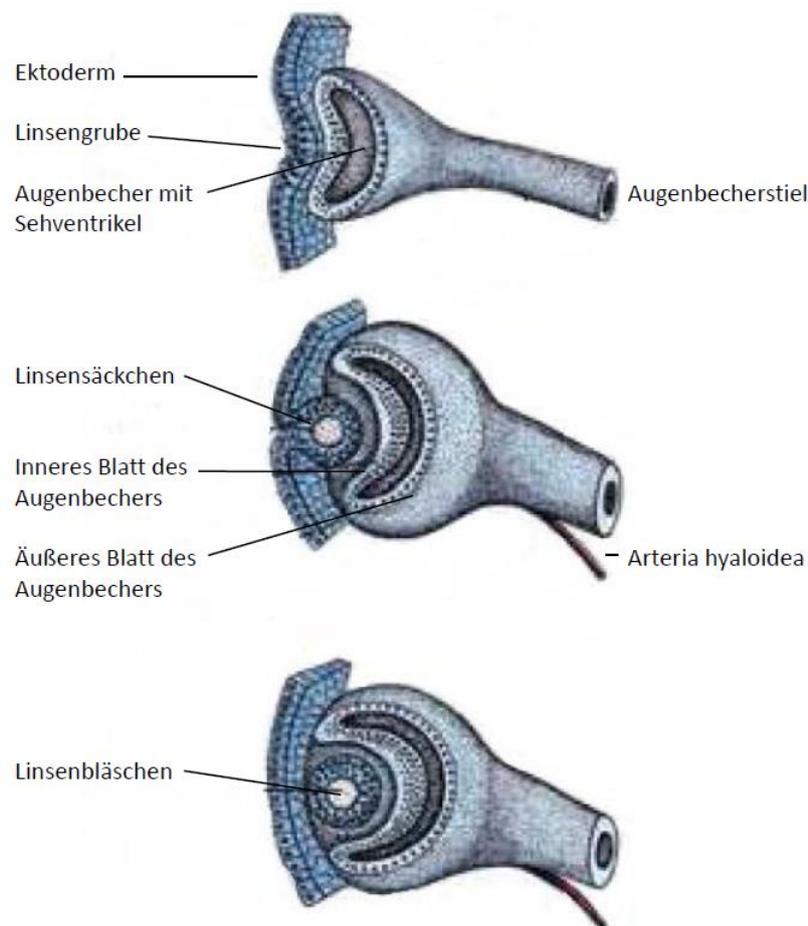


Abbildung 5: Schematische Darstellung der frühen Augenentwicklung bei Vertebraten. (modifiziert nach Schnorr und Kressin 2006).

Entwicklung der Linse

Signale der Augenblase sind notwendig, um eine vollständige Differenzierung der Linse aus dem Oberflächenektoderm zu induzieren. Es besteht dabei Adhäsion zwischen Augenblase und Oberflächenektoderm, jedoch kein direkter Zellkontakt (Gelatt 2014). Nach Ablösung des Linsenbläschens vom Oberflächenektoderm hat dieses eine nahezu sphärische Form und füllt den Augenbecher fast vollständig aus (Graw 2003; Schnorr und Kressin 2006). Das die entstehende Linse umgebende Mesenchym wird als *Tunica vascularis lentis* bezeichnet, es umgibt die Linse und versorgt diese durch die im hinteren Bereich verlaufende *Arteria hyaloidea* (Gelatt 2014; Schnorr und Kressin 2006). Das Linsenepithel scheidet nach außen die Linsenkapsel aus. Die vordere Wand des Linsenbläschens wird zum einschichtigen, isoprismatischen Linsenepithel umgewandelt, das Epithel im hinteren Bereich wächst hingegen in die Länge und füllt als Linsenfasern den Hohlraum aus (Schnorr und Kressin 2006). Die Anschichtung um den zentralen Linsenkern erfolgt vom Äquator her. Die Zellen drehen sich hier um 180°, ihre Kerne wandern ins Innere und bilden den Kernbogen bis sie im weiteren Verlauf der Entwicklung schließlich verschwinden. Zunächst erreichen die Linsenfasern noch den vorderen und hinteren Linsenpol. Im Verlauf der Entwicklung treten Lücken auf, die von einer Kittsubstanz ausgefüllt werden. Die entstehenden Linsensterne sind embryonal y-förmig, später vielgestaltig (Schnorr und Kressin 2006).

Entwicklung der Bestandteile der Retina

Eine differenzierte Entwicklung des inneren und äußeren Blattes des Augenbechers führt unter anderem zur Bildung der *Retina*. Der hintere Bereich des Augenbechers entwickelt sich dabei zur *Pars optica retinae*, dem lichtempfindlichen Abschnitt der *Retina*, der vordere Bereich des Augenbechers entwickelt sich zur *Pars caeca retinae*, dem lichtunempfindlichen Abschnitt der *Retina*. Getrennt werden diese Bereiche von der *Ora serrata* (Graw 2003; Schnorr und Kressin 2006; Chow und Lang 2001). Im hinteren Bereich (*Pars optica*) des Augenbechers bleibt das äußere Blatt einschichtig und differenziert sich zum *Stratum pigmentosum*. Das innere Blatt des Augenbechers entwickelt sich im Bereich der *Pars optica* durch zahlreiche Mitosen zum vielschichtigen *Stratum nervosum* (Schnorr und Kressin 2006). Der neurosensorische Teil der *Retina* entwickelt dabei Schichten verschiedener neuronaler Zellen. Dazu zählen die licht- und farbsensitiven Stäbchen und Zapfen, sowie bipolare Nervenzellen und die Ganglienzellschicht (Gilbert et al. 2003; Graw 2003; Schnorr und Kressin

2006). Im vorderen Bereich des Augenbechers (*Pars caeca*) bleiben beide Blätter einschichtig, das nicht pigmentierte innere Blatt verwächst mit dem pigmentierten äußeren Blatt zur *Pars ciliaris retinae*, diese überzieht den Ziliarkörper. An der Rückseite der *Iris* setzen sich beide Blätter als *Pars iridica retinae* fort und gehen am Pupillenrand ineinander über. Das Pigmentepithel der *Iris* hat sich im ausdifferenzierten Auge aus dem inneren Blatt des Augenbechers entwickelt, der *Musculus dilatator pupillae*, sowie der *Musculus sphincter pupillae* werden durch das äußere Blatt gebildet und sind damit ektodermalen Ursprungs (Schnorr und Kressin 2006).

Nervus opticus

Der voll entwickelte *Nervus opticus* verbindet das Auge mit den die visuellen Reize verarbeitenden Bereichen des Gehirns. Die Neuriten der Ganglienzellschicht der neurosensorischen Schicht der *Retina* vereinigen sich im Bereich des Augenbecherstiels und wachsen in diesen in Richtung des Gehirns ein. Der Augenbecherstiel verdickt sich durch die Vermehrung der Nervenzellen, der Stielventrikel verschwindet und die Augenspalte schließt sich. Der *Nervus opticus* geht somit aus dem Augenbecherstiel hervor. Zentral verläuft die *Arteria hyaloidea*, die spätere *Arteria centralis retinae* (Graw 2003; Schnorr und Kressin 2006).

Entwicklung der Kornea, der vorderen Augenkammer und der Iris

Die Entwicklung der *Kornea* unter anderem aus dem Oberflächenektoderm zu einer vielschichtigen, transparenten Struktur mit einer komplexen extrazellulären Matrix, entstanden aus Zellen unterschiedlichen Ursprungs, bedarf der Induktion durch die Linsenanlage (Gelatt 2014; Graw 2003). Das den Augenbecher umgebende Mesenchym wächst vorn zwischen Ektoderm und Linsenanlage ein, im Mesenchym tritt ein Spalt auf, der die Anlage der vorderen Augenkammer darstellt. *Kornea* und vordere Augenkammer entstehen also gleichzeitig (Schnorr und Kressin 2006). Aus den mesenchymalen Zellen zwischen Oberflächenektoderm und Augenbecher entwickeln sich die Endothelschicht der *Kornea*, das Stroma (*Substantia propria*), sowie die *Membrana pupillaris*, welche sich im Verlauf der Entwicklung wieder zurückbildet und damit die Kommunikation der vorderen und hinteren Augenkammer ermöglicht. Die hintere Augenkammer entsteht durch die Rückbildung der *Tunica vascularis lentis*. Die Epithelschicht der *Kornea* ist ektodermalen Ursprungs. Außerdem bildet das Mesenchym die Grundlage des *Irisstroma*, dieses verbindet

sich mit dem vorderen Augenbecherepithel (*Pars iridica retinae*) zur *Iris* (Gelatt 2014; Schnorr und Kressin 2006).

Glaskörper, Chorioidea, Sklera und Corpus ciliare

Der Glaskörper (*Corpus vitreum*) füllt einen großen Teil des voll entwickelten Auges aus, er besteht aus einer gelartigen, durchsichtigen Substanz und unterstützt die Struktur des Auges. Das durch die *Kornea*, vordere Augenkammer und die Linse einfallende Licht muss den Glaskörper passieren (Graw 2003). Der Glaskörper entsteht innerhalb des Augenbeckers aus Zellen des mit der *Arteria hyaloidea* einwachsenden Mesenchyms und Gliazellen der *Retina* (Schnorr und Kressin 2006). Die *Chorioidea* liegt zwischen der *Retina* und der *Sklera*, es handelt sich um eine gefäßreiche Aderhaut, die das Auge versorgt. Die faserreiche, weiße Augenhaut (*Sklera*) sowie die *Chorioidea* entwickeln sich aus dem dem Augenbecher direkt anliegenden Mesenchym. Aus den Zellen des Mesenchyms, zusammen mit dem *Pars ciliaris retinae* des Augenbeckers, entsteht das *Corpus ciliare* (Schnorr und Kressin 2006).

3.3.3.1 Der genetische Hintergrund, relevante Gene im Hinblick auf die Entstehung von nicht-syndromischer Mikrophthalmie und Anophthalmie

Die Entwicklung der Augen bei Vertebraten ist ein hochkomplexer, streng strukturierter Prozess innerhalb der Embryonalentwicklung (Graw 2003). In verschiedenen Modellen an Mensch und Tier konnten bereits einige hundert Gene identifiziert werden, die in diesem Prozess eine Rolle einnehmen (Plaisancié et al. 2019). Gene, die bereits zu Beginn der Augenentwicklung exprimiert werden und ganz bestimmte Kaskaden weiterer Genexpression initiieren, werden als so genannte Master-Kontrollgene bezeichnet. Mutationen dieser Gene, die an der Spitze der regulatorischen Hierarchie der Augenentwicklung stehen, konnten mit dem Auftreten von Mikrophthalmie und Anophthalmie in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren *SOX2* und *PAX6* (Graw 2003). Insgesamt konnten für den Menschen bereits mehr als 30 Gene wiederholt mit dem Auftreten von nicht-syndromischer Mikrophthalmie und Anophthalmie assoziiert werden. Viele weitere Gene stehen in Verbindung mit systemischen Erkrankungen, die Anomalien der Augen einschließen, welche dem Mikrophthalmie-Phänotyp ähneln oder gleichen (Plaisancié et al. 2019). Auch

Chromosomenmutationen, wie Duplikation, Translokation oder Deletion können ursächlich für Mikrophthalmie und Anophthalmie sein, stehen aber typischer Weise in Verbindung mit einem für die Mutation charakteristischen Syndrom. Die Ätiologie der Mikrophthalmie ist damit sehr komplex (Verma und Fitzpatrick 2007; Richardson et al. 2017). Die genetische Heterogenie, die enorme Variabilität des zu beobachtenden Phänotyps, sowie in einigen Fällen beobachtete unvollständige Penetranz stellen eine große Herausforderung in der genetischen Diagnostik dar (Graw 2003; Verma und Fitzpatrick 2007; Plaisancié et al. 2019). In Tab. 4 sind Gene aufgeführt, die in Verdacht stehen, für die Entstehung und Entwicklung nicht-syndromischer Mikophthalmie und Anophthalmie verantwortlich zu sein.

Tabelle 4: Auswahl einzelner Gene, die an der Entstehung und Entwicklung nicht-syndromischer Mikrophthalmie und Anophthalmie beteiligt sind (Modifiziert nach (Plaisancié et al. 2019; Richardson et al. 2017; Graw 2003)).

Gen ¹⁾	Funktion ²⁾	Spezies	Phänotyp/Informationen/Quelle
<i>SOX2</i>	TF	Mensch	Schwerwiegende Fehlbildungen der Augen, bilateral und unilateral, auch bilaterale Anophthalmie (Gerth-Kahlert et al. 2013; Ammar et al. 2017)
<i>OTX2</i>	TF	Mensch	Schwerwiegende Fehlbildungen der Augen, bilateral und unilateral, auch bilaterale Anophthalmie (Gerth-Kahlert et al. 2013)
<i>RAX</i>	TF	Mensch	Schwerwiegende Fehlbildungen der Augen, häufig bilateral, Anophthalmie und Mikrophthalmie kommen vor (Chassaing et al. 2014)
<i>VSX2</i>	TF	Mensch	Mikrophthalmie verbunden mit Kolobom und Katarakt (Ammar et al. 2017; Chassaing et al. 2014)

Gen¹⁾	Funktion²⁾	Spezies	Phänotyp/Information/Quelle
<i>STRA6</i>	MR	Mensch	Unterschiedlicher Ausprägungsgrad, Mikrophthalmie mit Kolobom, Anophthalmie, bilateral oder unilateral (Casey et al. 2011; Slavotinek et al. 2015)
<i>ALDH1A3</i>	MR	Mensch	Schwerwiegende Fehlbildungen der Augen, meist bilateral, häufig Anophthalmie oder schwere Mikrophthalmie (Plaisancié et al. 2016; Aldahmesh et al. 2013b)
<i>MAB21L2</i>		Mensch	Mikrophthalmie mit Kolobom, Anophthalmie, bilateral (Rainger et al. 2014)
<i>GDF3/GDF6</i>	SP	Mensch	Mikrophthalmie, Mikrophthalmie mit Kolobom, unilateral und bilateral (Ye et al. 2010)
<i>PAX6</i>	TF	Mensch	Mikrophthalmie bilateral mit Sklerokornea, Mikrophthalmie unilateral in Verbindung mit Iris Hypoplasie, Aniridie (Chassaing et al. 2014)
<i>PITX3</i>	TF	Schaf	Mikrophthalmie, bilateral (Becker et al. 2010)
		Mensch	Mikrophthalmie, bilateral mit Sklerokornea (Aldahmesh et al. 2011)
<i>PTCH1</i>	SP	Mensch	Mikrophthalmie mit Katarakt und Sklerokornea (Chassaing et al. 2016)
<i>MAF</i>	TF	Mensch	Mikrophthalmie, verschiedene Fehlbildungen der Augen (Anand et al. 2018)
<i>SIX6</i>	TF	Hund	Verschiedene Fehlbildungen der Augen, bilateral oder unilateral (Hug et al. 2019)
		Mensch	Mikrophthalmie, bilateral (Aldahmesh et al. 2013a)

Gen ¹⁾	Funktion ²⁾	Spezies	Phänotyp/Informationen/Quelle
<i>RBP4</i>	MR	Hund	Schwerwiegende Fehlbildungen der Augen, Mikrophthalmie, bilateral (Kaukonen et al. 2018)
		Mensch	Mikrophthalmie mit Kolobom, bilateral (Riera et al. 2017)
<i>MFRP</i>	SP	Mensch	Mikrophthalmie, Nanophthalmie, posterior (Patel et al. 2018)
<i>PRSS56</i>		Mensch	Mikrophthalmie, Nanophthalmie, posterior (Patel et al. 2018)

¹⁾ *SOX2*: SRY-box transcription factor 2; *OTX2*: Orthodenticle homeobox 2; *RAX*: Retina and anterior neural fold homeobox; *VSX2*: Visual system homeobox 2; *STRA6*: Signaling receptor and transporter of retinol 6; *ALDH1A3*: Aldehyde dehydrogenase 1 family member A3; *MAB21L2*: Protein mab-21 like 2; *BMP7*: Bone morphogenetic protein 7; *GDF3*: Growth differentiation factor 3; *GDF6*: Growth differentiation factor 6; *PAX6*: Paired box 6; *PITX3*: Paired like homeodomain 3; *PTCH1*: Protein patched homolog 1; *MAF*: Transcription factor Maf; *SIX6*: Six oculis homeobox homolog 6; *RBP4*: Retinol binding protein 4; *BMP4*: Bone morphogenetic protein 4; *MFRP*: Membrane frizzled-related protein; *PRSS56*: Serine Protease 56. Diese Gene kodieren unter anderem für Transkriptionsfaktoren, Signalproteine oder sind involviert im Metabolismus der Retinsäure

²⁾ Funktion: TF: Transkriptionsfaktor; MR: Metabolismus der Retinsäure; SP: Signalprotein

3.4 Equine Hereditary Microphthalmia

A. Bögeholz¹, C. Falker-Gieske¹, I. Kilic¹, T. Nissen², G. Thaller³, C. Drögemüller⁴, J. Tetens^{1,5}

¹ Department of Animal Science, Georg-August-University Göttingen, Burckhardtweg 2, 37077 Göttingen, Germany; anke.boegeholz@agr.uni-goettingen.de, clemens.falker-gieske@uni-goettingen.de, iwiedem@gwdg.de, jens.tetens@uni-goettingen.de

² Verband der Züchter des Holsteiner Pferdes e.V., Abteilung Zucht, D-24106 Kiel, Germany

³ Institute of Animal Breeding and Husbandry, Christian-Albrechts-University, Hermann-Rodewald-Str. 6, 24118 Kiel, Germany; gthaller@tierzucht.uni-kiel.de

⁴ Institute of Genetics, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bremgartenstr. 109a, 3012 Bern, Switzerland; cord.droegemueller@vetsuisse.unibe.ch

⁵ Center for Integrated Breeding Research, Georg-August-University Göttingen, Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen, Germany

Manuscript in preparation for publication

3.4.1 Introduction

Microphthalmia describes the presence of a small eye within the orbit. Some remnants of ocular tissue are always identifiable by histological examination. Complete absence of ocular tissue is called anophthalmia. A small but otherwise normal globe is called nanophthalmia, microphthalmia therefore presents as an abnormally small globe which may show various other ocular anomalies. Depending on the severity of the ocular malformations, vision may be normal, reduced or absent (Gelatt 2014; Verma and Fitzpatrick 2007). According to a classification scheme that has been established in human, microphthalmia refers to a globe with a total axial length at least two standard deviations below the mean for the respective age. For an adult, the lower 2.5% confidence limit for the total axial length is approximately 21.0 mm (Bardakjian et al. 1993). The overall prevalence of anophthalmia and microphthalmia was 1.0 per 10.000 births in the human population of England between 1988 and 1994 (Dolk et al. 1998). Both anophthalmia and microphthalmia may appear in an isolated form or as part of a syndrome with various other findings (Verma and Fitzpatrick 2007).

The development of a healthy and fully functional eye is a complex process, which starts early in embryonic development. Mutations that lead to clinically relevant phenotypes might affect genes that function at the top of the regulatory hierarchy and therefore at the initial stages of eye development. Mutations in these genes can lead to phenotypes like microphthalmia, anophthalmia and aniridia (Graw 2003). Isolated microphthalmia seems to be a rare condition in man, most patients have associated ocular anomalies and a high amount of cases is associated with multi systemic features forming part of a syndrome (Verma and Fitzpatrick 2007; Richardson et al. 2017).

Microphthalmia and anophthalmia occur in many different species as congenital defects. The OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals) database (<http://omia.angis.org.au>) comprises information about microphthalmia in chicken and 8 different mammals including for example different dog breeds, various cattle breeds and Texel sheep.

Anophthalmia and microphthalmia are therefore often associated with a wide range of genetic alterations but there are as well some environmental causes that might cause ocular malformations. Prenatal infections with for example rubella or *toxoplasma gondii* may lead to microphthalmos in the unborn foetus as well as drugs or other teratogens ingested by the mother during early pregnancy. Furthermore, there is evidence that irradiation, fever or hyperthermia are teratogenic and lead to ocular malformations. Other possible environmental

factors that might lead to microphthalmia are maternal diabetes and maternal Vitamin A deficiency (Dolk et al. 1998; Verma and Fitzpatrick 2007; Warburg 2009).

1.1 Microphthalmia in Horses

The overall incidence of congenital ocular diseases in the horse is considered to be low (Latimer et al. 1983). Microphthalmia has been described in different breeds and is considered to affect all breeds though thoroughbreds seem to have a higher incidence (Dziezyc et al. 1983; Mosier et al. 1983; Roberts 1992). Based on medical records at the Colorado State University-Veterinary Teaching Hospital, 5.3% of all recorded diagnoses in horses with ocular problems represented congenital anomalies. Microphthalmia accounted for 7.1% of these and therefore is one of the most common congenital ocular defects in horses (Roberts 1992). The defect shown in different cases demonstrate the wide range of morphological variation of the disease caused by the disturbance of embryogenesis at an early stage (Mosier et al. 1983). Microphthalmia might arise unilaterally or bilaterally, severity ranges from minimal to massive reduction in globe size. Unilateral cases may adapt to their monocular state. If the condition occurs bilateral, causing blindness, prospects are very poor and the foal has to be euthanized (Gilger 2011; Roberts 1992; Mosier et al. 1983). Most cases of microphthalmia in horses are considered to occur sporadically and idiopathically, in some cases intoxications during gestation have been associated with microphthalmia in the foal (Dziezyc et al. 1983; Schutte and van den Ingh 1997). There has been no genetic association in horses so far. Nevertheless, inheritance is suspected, but the mode is still unknown (Roberts 1992; Gilger 2011).

In 2011, a young stallion of the Holsteiner-Verband attracted attention with his first foal crop because of an unusual high number of microphthalmic foals. Around 80 foals were born in that year, among which a minimum of 10 cases of microphthalmia with varying severity were reported. Due to this fact, the stallion was immediately banned from further breeding. Thus, in 2012 only a few foals were born one of which also showed microphthalmia. Affected foals were born on different premises, in various geographical regions, at different times. Furthermore, other cases of microphthalmia occurred within the family structure of the stallion. Considering these observations we suspect hereditary equine microphthalmia in this family. The aim of the current study is to identify causal gene variants in order to develop a genetic test, which is suitable to avoid carrier mating.

3.4.2 Material and Methods

3.4.2.1 Animals, phenotypes and genotyping

EDTA blood samples, semen, skin tissue or hair samples were drawn from, in total 48 horses and foals for DNA extraction. This basis of data implied the Holsteiner stallion (EMO001), the founder of the half-sibling structure examined in this study (Figure 4 and 5). EMO001 is considered to be healthy and unaffected with microphthalmia. To our knowledge there are no records about any eye malformation or restriction in eyesight. The data basis also includes the unaffected mother (EMO005) of EMO001. An unaffected half-sister (EMO060) of EMO001 plus one affected foal (EMO061). An unaffected half-brother (EMO002) of EMO001 plus two affected foals (EMO062; EMO066). Furthermore, in total 19 mares with respective foals descending from EMO001. Of these 19 mares, one is affected with microphthalmia (EMO042) as well as the descending foal (EMO043) and six other foals (EMO004; EMO009; EMO013; EMO015; EMO018; EMO041) descending from EMO001. In addition, samples of an unaffected stallion (EMO080) belonging to the paternal bloodline of EMO001 and two microphthalmia affected foals (EMO081; EMO082), emerged from mating with one affected daughter of EMO001 belong to the data basis. In summary, 48 horses and foals were considered in this study of which 12 were unambiguously affected with non-syndromic microphthalmia presenting varying degrees of manifestation.

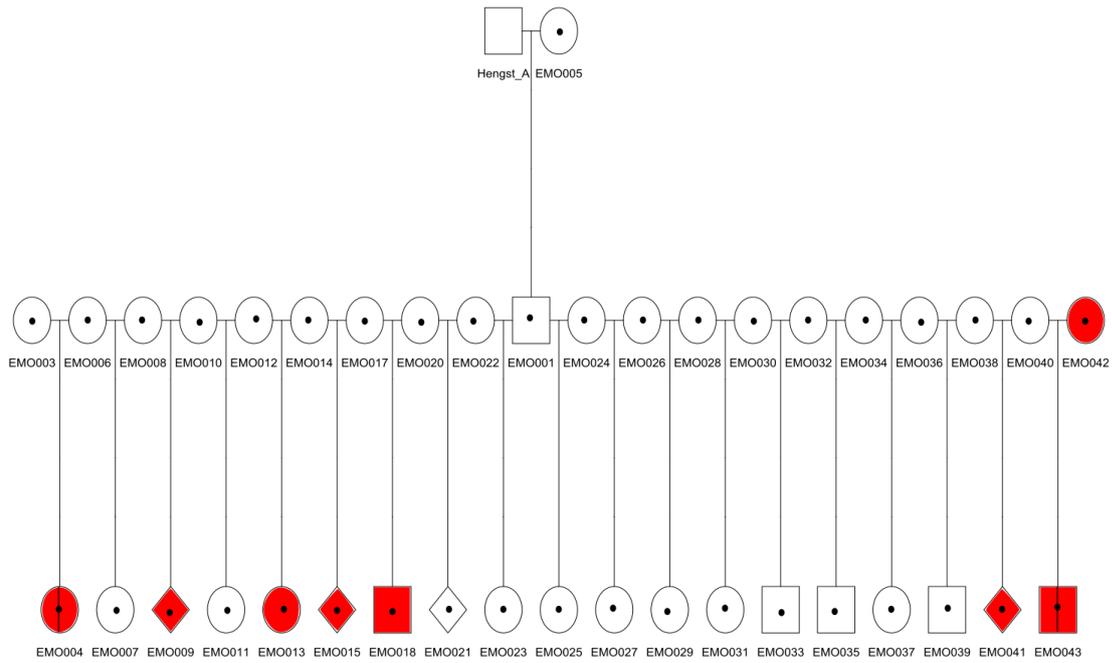


Figure 4: Pedigree of the Holsteiner stallion (EMO001) with mated mares and respective offspring

- = mare, not affected
- = stallion, not affected
- ◇ = gender unknown, not affected
- = mare, affected
- = Stallion, affected
- ◆ = gender unknown, affected
- = genotyped by means of the Illumina EquineSNP50 Genotyping BeadChip
- | = Whole-genome sequencing data available

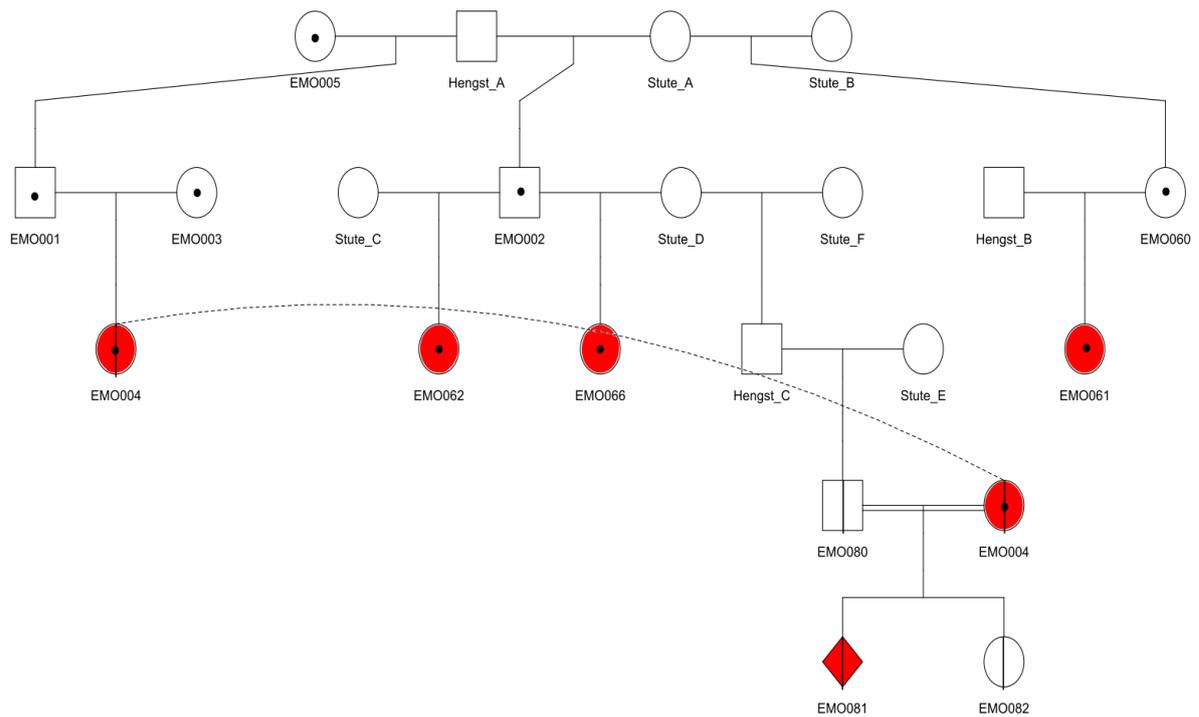


Figure 5: Family structure of EMO001 with half siblings and respective offspring affected by microphthalmia

(Symbols used analogous to Fig. 4)

45 of these animals (11 cases; 34 controls) were genotyped using the Illumina EquineSNP50 Genotyping BeadChip comprising a total of 57,132 markers. Quality control was accomplished using Plink 1.9 (Purcell et al. 2007). Only autosomal markers with a known position (EquCab3.0) were kept and filtered using thresholds of 10% missing genotypes per marker and a minor allele frequency of 0.05. This resulted in a total of 46,597 SNPs remaining for further analysis.

Additional whole genome sequencing was conducted for five animals. Comprising the unaffected stallion (EMO080) belonging to the paternal bloodline of EMO001. An affected daughter (EMO004) of EMO001 and the two foals, one affected (EMO081) one unaffected (EMO082), which emerged from the respective mating. As well as an affected foal (EMO043) descended from EMO001. The unaffected stallion (EMO080), and the two foals (EMO081; EMO082) which emerged from mating with an affected daughter (EMO004) of EMO001 were

not genotyped by the Illumina EquineSNP50 Genotyping BeadChip as these samples were not made available until a later stage. The mapping and variant calling were carried out using GATK v. 3.7 according to best practice guidelines (McKenna et al. 2010) and the genome assembly EquCab3.0

3.4.2.2 Genome wide association study

A genome wide association study (GWAS) was conducted applying a mixed linear model approach, using the software GCTA (Yang et al. 2011). All 45 animals, genotyped using the Illumina EquineSNP50 Genotyping BeadChip, were utilized in the GWAS. The genome-wide significance threshold was set by using the Bonferroni correction to account for multiple testing, to $P \leq 0.05/\text{number of markers}$. Visualisation was carried out with R (R Core Team 2020).

3.4.2.3 Candidate gene analysis RAX

In a second step, based on GWAS results, the *Retina and anterior neural fold homebox gene* (*RAX*) was chosen as a functional candidate gene. *RAX* is located on horse chromosome 8 (79,790,276-79,795,828 bp) (EquCab3.0) and is described to be essential for normal vertebrate eye development (Mathers et al. 1997). Using the software SnapGene Viewer (GSL Biotech 2020) all affected and unaffected animals, of which whole genome sequencing data was available, were compared. Two structural variants in proximity to *RAX* were found, one within intron 1 (79,792,749 bp) and one upstream of *RAX* (79,797,661 bp). Therefore, primers were designed, using the software Primer-Blast (Ye et al. 2012), in order to sequence those regions on Equine chromosome 8 in all animals belonging to the basis of data that were not used for whole genome sequencing before.

3.4.2.4 Candidate gene analysis CDH2

In addition, based on the results of the GWAS, the sequence data of the five animals of which whole genome sequencing data was available could be used to compare affected and non-affected animals in specific regions of the genome.

The variants of affected and unaffected animals in the *CDH2* gene (52,397,716-52,605,784 bp; EquCab3.0) were investigated. A variant effect predictor (VEP) with set default parameters (McLaren et al. 2016) was used to determine the influence of the respective variants. The variants were subsequently filtered as follows: 1) variants are in the coding region of the gene, 2) were not classified as modifiers, 3) consequence was not classified as a synonymous variant. This left 13 variants for further analysis (Tab. 1). For these variants, primers were designed with the software primer-Blast (Ye et al. 2012) to generate PCR products that were used to sequence the corresponding regions of all animals in the data base (Tab. 2).

Table 2: Variants within the coding regions of *CDH2* that were sequenced and studied in all 48 horses.

Primer 1)	Variant	Position (bp) ²⁾	Classification	Consequence
CDH2_1	1	52,408,443	Missense variant	Moderate
CDH2_2	2	52,428,472	Missense variant	Moderate
CDH2_2	3	52,428,481	Missense variant	Moderate
CDH2_2	4	52,428,485	Missense variant	Moderate
CDH2_3	5	52,433,560	Frameshift variant, splice region variant	High
CDH2_4	6	52,435,986	Missense variant	Moderate
CDH2_4	7	52,435,992	Missense variant	Moderate
CDH2_5	8	52,447,457	Inframe insertion, splice region variant	Moderate
CDH2_6	9	52,455,399	Missense variant	Moderate
CDH2_6n	9	52,455,399	Missense variant	Moderate
CDH2_7	10	52,574,089	Missense variant	Moderate
CDH2_7	11	52,574,165	Splice region variant, synonymous variant	Low
CDH2_8	12	52,604,421	Missense variant	Moderate
CDH2_8	13	52,604,430	Missense variant	Moderate

¹)Primer used for the respective PCR (see Tab. 2)

²)Position of the variant on chromosome 8

Table 3: List of designed and used forward and reverse primers for sequencing all selected variants within the gene *CDH2* on chromosome 8.

Primer ¹⁾	Variant	Primer sequenz (5'-3')	Product size (bp)
CDH2_1F	1	CCAAGCAACTTGTGGTCTACAT	323
CDH2_1R	1	TGTGTTTAAAAGCGAAGGTGGTA	
CDH2_2F	2,3,4	TGTGCTGTGAAGACTCTTTTGGTT	345
CDH2_2R	2,3,4	AATGCCCTCAAGTGTTACCTC	
CDH2_3F	5	AGGGTTTTCGTTCACGTCAATA	266
CDH2_3R	5	ACCTAGGGTGCTGGGAATGA	
CDH2_4F	6,7	GGTGACTAAGCCGTCGTTGC	268
CDH2_4R	6,7	GGACAGTAAATCTGGTCACCGGG	
CDH2_5F	8	ACTGTCCCATTCCAAACCTGG	288
CDH2_5R	8	CATGGAATTTGGCTCACTTATGTT	
CDH2_6F	9	TGAATCCTCTGGCAAGGTTGG	267
CDH2_6R	9	TTCCTTTGTAGGATAGTTGGACTCA	
CDH2_6nF	9	ATTGGCCATGCATCAATGT	499
CDH2_6nR	9	CCACAGTCTGGTATTCTCTAGTATGA	
CDH2_7F	10,11	AAAGGCCCCACAGTCTCATT	377
CDH2_7R	10,11	ACCATTCGGAAACAAAGGAGTTG	
CDH2_8F	12,13	GGCACCTCCCTTCCCG	350
CDH2_8R	12,13	CAGCTCTCTCCATTGGC	

3.4.3 Results

3.4.3.1 Genome wide association study

GWAS was carried out using the Illumina BeadChip data (43,597 markers), but no genome-wide significant association signals were detected. However, a peak is shown on Chromosome 8 (Figure 6, upper Figure). On Chromosome 8, in total 4 SNPs were above the chromosome-wide significance level (Figure 6, lower Figure).

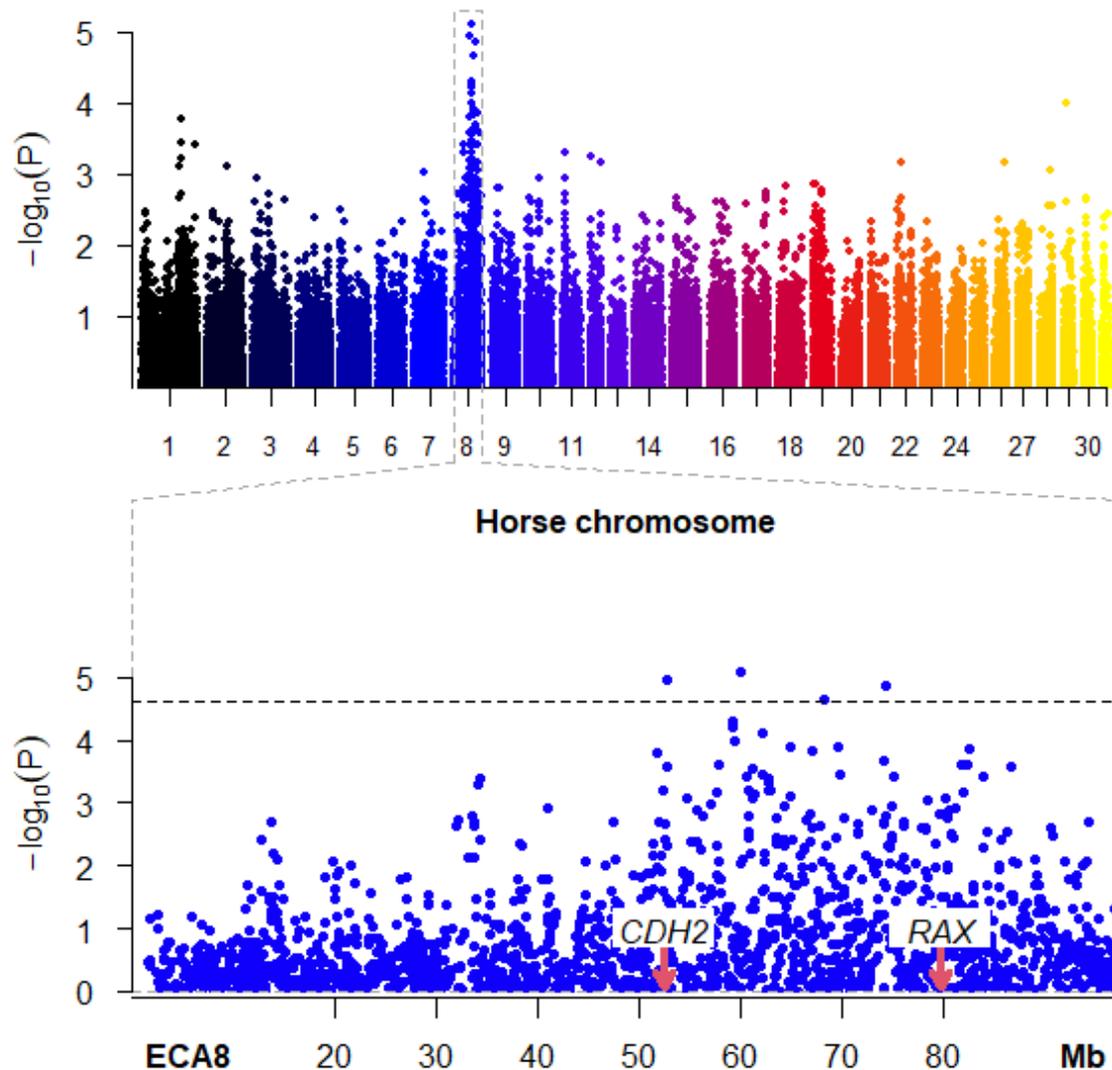


Figure 6: Manhattan-plot showing the negative decadic logarithms of the P values for association of SNPs genome wide with the occurrence of Microphthalmia (upper Figure) and on chromosome 8 (lower Figure). The horizontal line shows the chromosome-wide significance threshold after Bonferroni correction ($P \leq 0.05/2072$). The candidate genes *CDH2* and *RAX* on chromosome 8 were drawn according to their position (lower Figure).

The chromosome-wide significant SNPs on Chromosome 8 are located within 21,655,223 base pairs (bp) (52,704,014–74,359,237 bp). *RAX* is thus at a distance of 5,431,039 bp from the nearest significantly associated SNP of the GWAS. According to the genome assembly EquCab3.0, two of these SNPs are intergenic variations. One SNP (52,704,014 bp) is located in proximity to the *CDH2* gene, the other SNP (68,230,427 bp) is located between the *SLC14A1*

and the *SLC14A2* gene. The remaining SNPs are intron variants of two different genes. One SNP (60,122,336 bp) is located within intron 6 of the *FHOD3* gene. The other SNP (74,359,237 bp) is located within intron 2 of the *DCC* gene.

3.4.3.2 Candidate gene analysis RAX

Visual inspection of *RAX* on Chromosome 8 using whole genome sequencing data of five animals, three affected and two unaffected, did reveal structural variants in proximity to *RAX* at two locations in the affected horses, one within intron 1 (primer 205) and one upstream of *RAX* (primer 207). After sequencing those respective locations in all animals belonging to the basis of data, affected and unaffected animals were compared (Tab. 4). Most animals affected by microphthalmia show the genotype *AG/AA* except for an affected mare (EMO042, *GG/AG*), not related to EMO001 in a direct line, and a foal (EMO013) descended from EMO001 (*AG/AG*) as well as an affected foal (EMO066, *GG/AA*) descended from EMO002, a half-brother of EMO001. EMO001 is the only animal that shows the genotype *AG/AA* while not being recognized as affected with microphthalmia.

Table 4: Genotypes of all animals of the data basis sequenced for two structural variants in the region of the *RAX* gene.

LabID	Father ¹⁾	Mother ¹⁾	Status ²⁾	Genotype	
				Primer 205	Primer 207
EMO001	Vorfahre01	EMO005	1	AG	AA
EMO002	Vorfahre01	0	1	AG	AG
EMO003	0	0	1	GG	AG
EMO004	EMO001	EMO003	2	AG	AA
EMO005	0	0	1	GG	AG
EMO006	0	0	1	GG	AG
EMO007	EMO001	EMO006	1	GG	AG
EMO008	0	0	1	GG	AA
EMO009	EMO001	EMO008	2	AG	AA
EMO010	0	0	1	GG	GG
EMO011	EMO001	EMO010	1	AG	AG
EMO012	0	0	1	GG	AG

LabID	Father ¹⁾	Mother ¹⁾	Status ²⁾	Genotype	
				Primer 205	Primer 207
EMO013	EMO001	EMO012	2	AG	AG
EMO014	0	0	1	GG	AA
EMO015	EMO001	EMO014	2	AG	AA
EMO017	0	0	1	GG	AA
EMO018	EMO001	EMO017	2	AG	AA
EMO020	0	0	1	GG	GG
EMO021	EMO001	EMO020	1	AG	AG
EMO022	0	0	1	GG	GG
EMO023	EMO001	EMO022	1	GG	AG
EMO024	0	0	1	GG	AG
EMO025	EMO001	EMO024	1	GG	AG
EMO026	0	0	1	GG	GG
EMO027	EMO001	EMO026	1	AG	AG
EMO028	0	0	1	GG	AA
EMO029	EMO001	EMO028	1	GG	AA
EMO030	0	0	1	GG	AG
EMO031	EMO001	EMO030	1	GG	AG
EMO032	0	0	1	GG	AG
EMO033	EMO001	EMO032	1	GG	AG
EMO034	0	0	1	GG	GG
EMO035	EMO001	EMO034	1	GG	AG
EMO036	0	0	1	GG	AG
EMO037	EMO001	EMO036	1	GG	AG
EMO038	0	0	1	GG	AA
EMO039	EMO001	EMO038	1	GG	AA
EMO040	0	0	1	GG	AG
EMO041	EMO001	EMO040	2	AG	AA
EMO042	0	0	2	GG	AG
EMO043	EMO001	EMO042	2	AG	AA
EMO060	Vorfahre01	0	1	AA	AA
EMO061	0	EMO060	2	AG	AA
EMO062	EMO002	0	2	AG	AA
EMO066	EMO002	0	2	GG	AA
EMO080	Vorfahre02	0	1	GG	AG
EMO081	EMO080	EMO004	2	AG	AA
EMO082	EMO080	EMO004	1	GG	AG

¹⁾0=Father/Mother unknown; ²⁾1=unaffected, 2=affected

3.4.3.3 Candidate gene analysis CDH2

The sequence data of the selected variants in the coding regions of the *CDH2* gene (Tab. 3) of all animals of the data basis did not show any variation that could be related to the respective observed phenotype.

3.4.4 Discussion

Formation of the eye is a highly complex process, directed by a network of genes, which starts at an early stage in embryonic development. Any disruption of the morphogenetic events by genetic or environmental influences can lead to structural defects such as microphthalmia (Charon und Lipka 2015; Plaisancié et al. 2019). Referring to the OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals) database (<http://omia.angis.org.au>) until now, causal gene variants responsible for microphthalmia in animals only have been found in Texel sheep, a Holstein calf and Irish soft-coated wheaten terriers (Becker et al. 2010; Wiedemar und Drögemüller 2014; Kaukonen et al. 2018). Thus, the aim of the current study was to identify the potential causal gene responsible for the cumulative occurrence of microphthalmia within the family structure of a young German Warmblood stallion. Information about 48 horses belonging to a half-sibling breeding population, of which 12 horses were affected with non-syndromic microphthalmia was included in this study.

The GWAS using 46,597 SNPs did not reveal any genome-wide significant association (Fig. 6). However, 4 chromosome-wide significant association signals were detected on chromosome 8 (Fig. 6), located within 21,655,223 bp (52,704,014-74,359,237 bp).

One SNP (52,704,014 bp), an intergenic variation, is located in proximity to the *CDH2* gene. *CDH2* encodes for *N-cadherin*, a subclass of a family of glycoproteins, Cadherins, which play a crucial role in construction of tissues and the whole animal body. *N-cadherin* is a transmembrane protein that mediates Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion mechanism in multiple tissues and plays an important role in embryonic development (Takeichi 1988; Reis et al. 2019). In mice, it has been shown that *N-cadherin* plays an essential role in vertebrate lens development, *N-cadherin* conditional knockout mutants exhibited common structural deficits, including microphthalmia and other ocular findings (Pontoriero et al. 2009). In man

CDH2 variants have been associated with Peters anomaly, a rare congenital abnormality of the anterior segment of the eye with a range of disease severity from unilateral cases up to bilateral cases associated with microphthalmia, cataract and multiple systemic malformations (Reis et al. 2019; Ni et al. 2015; Bhandari et al. 2011). According to those results, a mutation variant of the *CDH2* gene, or a mutation inside of a regulatory region of this gene, might be associated with the occurrence of microphthalmia in horses, as it plays a crucial role in early embryonic development and has been associated with various malformations of the eye. Nevertheless, the investigation of selected variants in the coding regions of the gene has so far been unable to provide any indications of a causal relationship between these and the respective phenotype observed. Further investigation of *CDH2* also in its regulatory regions should take place to clarify the potential role of this gene in the development and occurrence of microphthalmia in horses.

Non-syndromic microphthalmia has been associated with a number of genes that function at the initial stages of eye development (Graw 2003; Verma und Fitzpatrick 2007; Zagozewski et al. 2014). Based on the GWAS results, we searched for a gene, associated with non-syndromic microphthalmia on horse chromosome 8. The *Retina and anterior neural fold homeobox gene (RAX)* was chosen as a functional candidate gene. *RAX* has been described as essential for normal vertebrate eye development (Mathers et al. 1997) and several studies refer to a mutation of the *RAX* gene as a possible cause for the occurrence of microphthalmia in different species (Graw 2003; Verma und Fitzpatrick 2007; Zagozewski et al. 2014; Plaisancié et al. 2019; Richardson et al. 2017). Visual inspection of *RAX* (79,790,276-79,795,828 bp) and its adjacent regions using whole genome sequencing data did reveal two structural variants in proximity to *RAX* in the affected horses. Sequencing data of those respective locations in all 48 horses revealed that most animals affected by microphthalmia show the genotype AG/AA except for three horses of which one is an affected mare, not related to EMO001 in a direct line (GG/AG). One affected foal of EMO001 showed the genotype AG/AG and another foal, descended from EMO002, a half-brother of EMO001, showed the genotype GG/AA. EMO001 is the only horse that shows the genotype AG/AA while not being affected with microphthalmia. In humans, variable expressivity and incomplete penetrance are commonly associated with anophthalmia and microphthalmia (Plaisancié et al. 2019). In the present case, this could be an explanation for the occurrence of the affected genotype in an animal diagnosed as unaffected. The highly variable phenotypic expression of the genotype might cause problems in detecting affected

horses, as a simple microphthalmos, resulting in a slightly smaller, but normal globe, could be challenging to identify. As microphthalmia has been associated with a wide range of genetic alterations, the affected mare, not related to EMO001 in a direct line, could harbour a different causal genetic mutation responsible for the occurrence of microphthalmia. Studies, comprising affected horses of other bloodlines would be necessary to identify possible other genetic alterations causing microphthalmia in horses. Furthermore, miscellaneous environmental factors could cause ocular malformations and are a possible additional issue for the occurrence of microphthalmia in horses.

Until now we were not able to unambiguously identify the causal genetic mutation responsible for the occurrence of equine microphthalmia in the present family structure of Holstein horses. However, 4 chromosome-wide significant SNPs were detected on chromosome 8, indicating that the putative causal genetic variation involved in the development of microphthalmia might be located in the respective region. The role of *CDH2* in the development of this condition needs to be further analysed. The other three SNPs on chromosome 8, which are associated with the occurrence of microphthalmia, are located in proximity to different genes which have not been associated with microphthalmia so far. The candidate gene approach investigating *RAX* on chromosome 8 did show two structural variances in proximity to the gene. It might be possible that those variants are involved in the development and occurrence of microphthalmia in this family structure. As the quality of the horse genome annotation needs improvement (Jagannathan et al. 2019), possible candidate genes, or regulatory regions that could affect gene regulation, might not be found yet. In consideration of the present family structure, it is shown that in the past affected mares have been part of the breeding population and that risk mating did lead to other affected descendants. Therefore, as we suspect the presence of hereditary equine microphthalmia in this family, we would strongly advise to consider this fact in future breeding decisions and exclude affected animals from the breeding population.

References

- Bardakjian, Tanya; Weiss, Avery; Schneider, Adele (1993): GeneReviews®. Microphthalmia/Anophthalmia/Coloboma Spectrum. Hg. v. Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, Karen Stephens und Anne Amemiya. Seattle (WA).
- Becker, D.; Tetens, J.; Brunner, A.; Burstel, D.; Ganter, M.; Kijas, J.; Drogemuller, C. (2010): Microphthalmia in Texel sheep is associated with a missense mutation in the paired-like homeodomain 3 (PITX3) gene. In: *PloS one* 5 (1), e8689. DOI: 10.1371/journal.pone.0008689.
- Bhandari, Ramanath; Ferri, Sara; Whittaker, Beatrice; Liu, Margaret; Lazzaro, Douglas R. (2011): Peters anomaly: review of the literature. In: *Cornea* 30 (8), S. 939–944. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31820156a9.
- Charon, K. M.; Lipka, K. R. (2015): The Effect of a Coat Colour-Associated Genes Polymorphism on Animal Health – A Review. In: *Annals of Animal Science* 15 (1). DOI: 10.2478/aoas-2014-0066.
- Dolk, H.; Busby, A.; Armstrong, B. G.; Walls, P. H. (1998): Geographical variation in anophthalmia and microphthalmia in England, 1988-94. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 317 (7163), 905-9; discussion 910. DOI: 10.1136/bmj.317.7163.905.
- Dziezyc, J.; KERN, T. J.; WOLF, E. (1983): Microphthalmia in a foal. In: *Equine Veterinary Journal* 15 (S2), S. 15–17. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb04548.x.
- Gelatt, Kirk N. (Hg.) (2014): Essentials of veterinary ophthalmology. Third edition. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/9781118910337>.
- Gilger, B. C. (2011): Equine ophthalmology. 2nd ed. St. Louis Mo.: Elsevier Saunders.
- Graw, Jochen (2003): The genetic and molecular basis of congenital eye defects. In: *Nature reviews. Genetics* 4 (11), S. 876–888. DOI: 10.1038/nrg1202.
- GSL Biotech (2020): SnapGene® software. Online verfügbar unter <https://www.snapgene.com>.

- Jagannathan, V.; Gerber, V.; Rieder, S.; Tetens, J.; Thaller, G.; Drögemüller, C.; Leeb, T. (2019): Comprehensive characterization of horse genome variation by whole-genome sequencing of 88 horses. In: *Animal genetics* 50 (1), S. 74–77. DOI: 10.1111/age.12753.
- Kaukonen, Maria; Woods, Sean; Ahonen, Saija; Lemberg, Seppo; Hellman, Maarit; Hytönen, Marjo K. et al. (2018): Maternal Inheritance of a Recessive RBP4 Defect in Canine Congenital Eye Disease. In: *Cell reports* 23 (9), S. 2643–2652. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.118.
- Latimer, C. A.; WYMAN, M.; HAMILTON, J. (1983): An ophthalmic survey of the neonatal horse. In: *Equine Veterinary Journal* 15 (S2), S. 9–14. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb04547.x.
- Mathers, P. H.; Grinberg, A.; Mahon, K. A.; Jamrich, M. (1997): The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. In: *Nature* 387 (6633), S. 603–607. DOI: 10.1038/42475.
- McKenna, Aaron; Hanna, Matthew; Banks, Eric; Sivachenko, Andrey; Cibulskis, Kristian; Kernytsky, Andrew et al. (2010): The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. In: *Genome research* 20 (9), S. 1297–1303. DOI: 10.1101/gr.107524.110.
- McLaren, William; Gil, Laurent; Hunt, Sarah E.; Riat, Harpreet Singh; Ritchie, Graham R. S.; Thormann, Anja et al. (2016): The Ensembl Variant Effect Predictor. In: *Genome biology* 17 (1), S. 122. DOI: 10.1186/s13059-016-0974-4.
- Mosier, Derek A.; ENGELMAN, R. W.; CONFER, A. W.; McCARROLL, G. D. (1983): Bilateral multiple congenital ocular defects in Quarterhorse foals. In: *Equine Veterinary Journal* 15 (S2), S. 18–20. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb04549.x.
- Ni, Wei; Wang, Wei; Hong, Jing; Zhang, Pei; Liu, Cong (2015): A novel histopathologic finding in the Descemet's membrane of a patient with Peters Anomaly: a case-report and literature review. In: *BMC ophthalmology* 15, S. 139. DOI: 10.1186/s12886-015-0131-y.
- Plaisancié, J.; Ceroni, F.; Holt, R.; Zazo Seco, C.; Calvas, P.; Chassaing, N.; Ragge, Nicola K. (2019): Genetics of anophthalmia and microphthalmia. Part 1. Non-syndromic anophthalmia/microphthalmia. In: *Human genetics* 138 (8-9), S. 799–830. DOI: 10.1007/s00439-019-01977-y.

Pontoriero, Giuseppe F.; Smith, April N.; Miller, Leigh-Anne D.; Radice, Glenn L.; West-Mays, Judith A.; Lang, Richard A. (2009): Co-operative roles for E-cadherin and N-cadherin during lens vesicle separation and lens epithelial cell survival. In: *Developmental biology* 326 (2), S. 403–417. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.10.011.

Purcell, Shaun; Neale, Benjamin; Todd-Brown, Kathe; Thomas, Lori; Ferreira, Manuel A. R.; Bender, David et al. (2007): PLINK. A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. In: *American journal of human genetics* 81 (3), S. 559–575. DOI: 10.1086/519795.

R Core Team (2020): R: A Language and Environment for Statistical Computing. Version 3.4.2.

Reis, Linda M.; Houssin, Nathalie S.; Zamora, Carlos; Abdul-Rahman, Omar; Kalish, Jennifer M.; Zackai, Elaine H. et al. (2019): Novel variants in CDH2 are associated with a new syndrome including Peters anomaly. In: *Clinical genetics*. DOI: 10.1111/cge.13660.

Richardson, Rose; Sowden, Jane; Gerth-Kahlert, Christina; Moore, Anthony T.; Moosajee, Mariya (2017): Clinical utility gene card for. Non-Syndromic Microphthalmia Including Next-Generation Sequencing-Based Approaches. In: *European journal of human genetics : EJHG* 25 (4). DOI: 10.1038/ejhg.2016.201.

Roberts, Steven M. (1992): Congenital Ocular Anomalies. In: *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 8 (3), S. 459–478. DOI: 10.1016/S0749-0739(17)30436-4.

Schutte, J. G.; van den Ingh, T. S. (1997): Microphthalmia, brachygnathia superior, and palatocheiloschisis in a foal associated with griseofulvin administration to the mare during early pregnancy. In: *The Veterinary quarterly* 19 (2), S. 58–60. DOI: 10.1080/01652176.1997.9694741.

Takeichi, M. (1988): The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. In: *Development (Cambridge, England)* 102 (4), S. 639–655.

Verma, Amit S.; Fitzpatrick, David R. (2007): Anophthalmia and microphthalmia. In: *Orphanet journal of rare diseases* 2, S. 47. DOI: 10.1186/1750-1172-2-47.

Warburg, Mette (2009): Update of Sporadic Microphthalmos and Coloboma Non-Inherited Anomalies Dedicated to Barrie Jay. In: *Ophthalmic Paediatrics and Genetics* 13 (2), S. 111–122. DOI: 10.3109/13816819209087611.

Wiedemar, Natalie; Drögemüller, Cord (2014): A 19-Mb de novo deletion on BTA 22 including MITF leads to microphthalmia and the absence of pigmentation in a Holstein calf. In: *Animal genetics* 45 (6), S. 868–870. DOI: 10.1111/age.12213.

Yang, Jian; Lee, S. Hong; Goddard, Michael E.; Visscher, Peter M. (2011): GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. In: *American journal of human genetics* 88 (1), S. 76–82. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.11.011.

Ye, Jian; Coulouris, George; Zaretskaya, Irena; Cutcutache, Ioana; Rozen, Steve; Madden, Thomas L. (2012): Primer-BLAST. A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In: *BMC bioinformatics* 13, S. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

Zagozewski, J. L.; Zhang, Q.; Eisenstat, D. D. (2014): Genetic regulation of vertebrate eye development. In: *Clinical genetics* 86 (5), S. 453–460. DOI: 10.1111/cge.12493.

3.5 Zusammenfassung

Bei der Mikrophthalmie handelt es sich um eine neonatal auftretende ophthalmologische Erkrankung, bei der es zu einer Verkleinerung und in den meisten Fällen auch zu weiteren strukturellen Anomalien eines Augapfels oder auch beider Augäpfel kommt. Es sind immer okulare Strukturen innerhalb der Orbita nachweisbar, je nach Schweregrad der Erkrankung ist die Sehfähigkeit der betroffenen Augen uneingeschränkt, reduziert oder auch nicht vorhanden (Verma und Fitzpatrick 2007; Gelatt 2014). Zurückzuführen ist die Mikrophthalmie auf eine Störung während der embryonalen Augenentwicklung. Grund für diese Störung können Mutationen in für die Entwicklung der Augen relevanten Genen sowie verschiedene Umwelteinflüsse sein (Dolk et al. 1998; Graw 2003; Verma und Fitzpatrick 2007; Warburg 2009). Beschrieben wurde diese Erkrankung bereits in verschiedenen Spezies, die equine Mikrophthalmie ist eine der häufigsten gestellten Diagnosen aller kongenital auftretenden Augendefekte des Pferdes (Roberts 1992). Insgesamt treten kongenitale Augendefekte bei Pferden eher selten in Erscheinung und spielen daher keine große wirtschaftliche Rolle in der Pferdezucht (Latimer et al. 1983; Gilger 2011). Im Jahr 2011 trat ein junger Hengst des Holsteiner Verbandes (EMO001) mit seinem ersten Fohlenjahrgang in den Fokus, da dieser eine ungewöhnlich hohe Anzahl mikrophthalmischer Nachkommen aufwies. Auf Grund der hohen Frequenz des Auftretens der Erkrankung und der Tatsache, dass die betroffenen Fohlen auf unterschiedlichen Betrieben zu unterschiedlichen Zeitpunkten geboren wurden, musste von einer Erbllichkeit der Erkrankung in dieser Familienstruktur ausgegangen werden. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die für die Mikrophthalmie in dieser Familie kausalen Genvarianten zu identifizieren, den möglichen Erbgang zu verstehen und damit die Entwicklung geeigneter genetischer Tests zu ermöglichen, um in Zukunft Risikoanpaarungen vermeiden zu können und die Frequenz des Auftretens der Erkrankung zu verringern. Die Datengrundlage bestand aus insgesamt 48 Pferden und Fohlen, von diesen Tieren zeigten 12 variierende Grade der Manifestation einer Mikrophthalmie. Eine durchgeführte GWAS konnte keine genomweit signifikant mit dem Auftreten der Erkrankung assoziierten SNPs nachweisen. Auf dem Chromosomen 8 konnten jedoch vier chromosomenweit signifikant assoziierte SNPs gefunden werden. Einer der vier signifikant assoziierten SNPs liegt in der Nähe des Gens *CDH2*. Dieses Gen kodiert für das Protein *N-cadherin*, dem eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und auch in der Entwicklung der Augen zugesprochen wurde (Takeichi 1988; Gelatt 2014; Reis et al. 2019). Die Sequenzierung und Untersuchung ausgewählter

Varianten in den codierenden Bereichen des Gens konnten jedoch nicht auf eine Assoziation dieser mit dem beobachteten Phänotypen schließen lassen. Weitere Untersuchungen der regulatorischen Bereiche des Gens wären sinnvoll, um eine mögliche Beteiligung von *CDH2* am Auftreten der Erkrankung ausschließen oder aber bestätigen zu können. Auf Grundlage der Ergebnisse der GWAS wurde auf Chromosomen 8 nach einem möglichen funktionellen Kandidatengen gesucht, welches mit dem Auftreten der Erkrankung in Verbindung stehen könnte. Das *Retina and anterior neural fold homeobox (RAX)* Gen liegt bei Pferden auf dem Chromosomen 8 und wurde bereits als ursächlich für das Auftreten von Mikrophthalmie in verschiedenen Spezies beschrieben (Graw 2003; Verma und Fitzpatrick 2007; Zagozewski et al. 2014; Richardson et al. 2017; Plaisancié et al. 2019). *RAX* sowie die angrenzenden Bereiche des Gens wurden, unter Verwendung der zur Verfügung stehenden Sequenzdaten von fünf Tieren (3 betroffen, 2 nicht betroffen), untersucht. Es konnten zwei Varianten gefunden werden, diese wurden für alle 48 Tiere der Datengrundlage nachsequenziert und untersucht. Der Großteil der von Mikrophthalmie betroffenen Pferde zeigte den zuvor mit der Erkrankung assoziierten Genotypen AG/AA. Jedoch zeigten drei der betroffenen Tiere einen anderen Genotypen, darunter ein direkter Nachkomme des Hengstes EMO001. Der Hengst EMO001 war das einzige Tier, welches den mit der Erkrankung assoziierten Genotypen aufwies, aber unseres Wissens nach keinerlei Anzeichen der Erkrankung zeigte. Auf Grundlage der Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Varianten im Bereich des *RAX* Gens nicht als alleinig ursächlich für das Auftreten der Erkrankung in dieser Familienstruktur angesehen werden können. Es konnte bis zu diesem Zeitpunkt keine eindeutig kausale Genvariante identifiziert werden, die für das gehäufte Auftreten der Mikrophthalmie in der vorliegenden Familienstruktur verantwortlich sein könnte. Die Beteiligung mehrerer Gene und auch regulatorischer Regionen im Genom sowie eine geringe Genotyp-Phänotyp-Korrelation scheint wahrscheinlich. Auch ist es möglich, dass Faktoren wie eine unvollständige Penetranz und eine variable Expressivität die Identifikation kausaler Genvarianten erschweren. Die Entwicklung eines genetischen Testverfahrens zur Identifikation potentieller Merkmalsträger ist daher zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Betroffene Tiere sollten zukünftig in jedem Fall von der Zuchtpopulation ausgeschlossen werden, da eine Erbllichkeit der equinen Mikrophthalmie in vielen Fällen als sehr wahrscheinlich angesehen werden muss.

3.6 Summary

Microphthalmia describes the presence of a small eye within the orbit. Some remnants of ocular tissue are always identifiable by histological examination. It is a neonatal ophthalmological disease, in most cases further structural abnormalities of one or both eyeballs are present. Depending on the severity of the disease the vision of the affected eye is unrestricted, reduced or even absent (Verma und Fitzpatrick 2007; Gelatt 2014). Microphthalmia can be traced back to a disorder during embryonic eye development. The reason for this disorder could be a mutation in genes relevant for the development of the eye as well as various environmental influences (Dolk et al. 1998; Graw 2003; Verma und Fitzpatrick 2007; Warburg 2009). Microphthalmia has already been described in different species, equine microphthalmia is one of the most common diagnoses among all congenital eye defects reported in horses (Roberts 1992). In general, congenital eye defects in horses occur rather rarely and therefore do not play a major economic role in horse breeding (Latimer et al. 1983; Gilger 2011). During its first breeding period, a young stallion of the Holsteiner Verband (EMO001) came into focus, as he had an unusual high number of microphthalmic offspring. Due to the high frequency of the disease and the fact that the affected foals were born at different times on different farms, it had to be assumed that the disease was hereditary in this family structure. The aim of the present study was to identify the gene variants causal for microphthalmia in this family, to understand the possible inheritance and thus to enable the development of suitable genetic tests in order to avoid risk matings in the future and to reduce the frequency of occurrence of the disease. The data basis consisted of 48 horses and foals, 12 of which showed varying degrees of microphthalmia. A performed GWAS could not detect any SNPs significantly associated with the occurrence of the disease on a genome-wide basis. However, four SNPs significantly associated with microphthalmia on a chromosome wide level were found on chromosome 8. One of the four significantly associated SNPs is located near the gene *CDH2*. This gene codes for the protein *N-cadherin*, which is believed to play an important role in embryonic and ocular development (Takeichi 1988; Gelatt 2014; Reis et al. 2019). Yet, sequencing and examination of selected variants in the coding regions of the gene could not indicate an association of these with the observed phenotype. Further investigations of the regulatory areas of the gene would be useful to exclude or confirm a possible involvement of *CDH2* in the occurrence of the disease. Based on the results of the GWAS, a possible functional candidate gene on chromosome 8 was searched

for, which could be associated with the occurrence of the disease. The *Retina and anterior neural fold homebox (RAX)* gene is located on chromosome 8 in horses and has been described as the cause of microphthalmia in several species (Graw 2003; Verma und Fitzpatrick 2007; Zagozewski et al. 2014; Richardson et al. 2017; Plaisancié et al. 2019). *RAX* as well as the adjacent regions of the gene were investigated using the available sequence data from five animals (3 affected, 2 not affected). Two variants were found, which were re-sequenced and examined for all 48 animals in our data set. The majority of horses affected by microphthalmia showed the genotypes *AG/AA* previously associated with the disease, whereas three of the affected animals showed a different genotype, including a direct descendant of the stallion EMO001. The stallion EMO001 was the only animal that showed the genotype associated with the disease, but to our knowledge has no record of any signs of the disease. Based on the results, it must be assumed that the variants found in the *RAX* gene cannot be considered the only causal factor for the occurrence of the disease in this family structure. Until now, no clearly causal gene variant has been identified that could be responsible for the increased occurrence of microphthalmia in the present family structure. The involvement of several genes and also regulatory regions in the genome as well as a low genotype-phenotype correlation seems to be probable. It is also possible that factors such as incomplete penetrance and variable expressivity may complicate the identification of causal gene variants. The development of a genetic test procedure for the identification of potential trait carriers is therefore not possible at this stage. Affected animals should in any case be excluded from the breeding population in the future, as heredity of equine microphthalmia must be considered very probable in many instances.

4 Allgemeine Diskussion

Die vorliegende Dissertation besteht aus Untersuchungen zweier unterschiedlicher, erblicher Erkrankungen der Augen, in zwei verschiedenen Spezies. Der erste Abschnitt der Arbeit hatte die Zielsetzung, die genetische Architektur der Erkrankung Boviner bilateraler konvergenter Strabismus mit Exophthalmus (BCSE) bei Tieren der Rasse Holstein zu verstehen und kausal beteiligte Genomregionen zu identifizieren. Der zweite Abschnitt der Arbeit beschäftigte sich mit der equinen Mikrophthalmie, im Speziellen mit der Untersuchung des gehäuftten Vorkommens der Erkrankung in einer Halbgeschwister-Familienstruktur eines Hengstes des Holsteiner Verbandes. Die Zielsetzung dieser Untersuchung lag ebenfalls darin, die kausal beteiligten Genvarianten zu identifizieren sowie den zugrundeliegenden Vererbungsweg verstehen und nachvollziehen zu können.

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Untersuchungen sollte nach Möglichkeit die Entwicklung geeigneter genetischer Tests erfolgen. Diese könnten Zuchtentscheidungen unterstützen und gegebenenfalls den Ausschluss von Merkmalsträgern aus der Zuchtpopulation gewährleisten, um damit die Frequenz des Auftretens der Erkrankungen innerhalb dieser senken zu können.

Beide Untersuchungen konnten Hinweise auf möglicherweise beteiligte Genomregionen und potentiell beteiligte Gene geben. Eindeutig kausale Gene konnten jedoch in beiden Untersuchungen nicht gefunden werden. Weitere Studien sind notwendig, um die Beteiligung der gefundenen Regionen genau bestimmen und einschätzen zu können.

Erkrankungen der Augen, die die Sehfähigkeit der betroffenen Tiere stark einschränken, haben einen großen Einfluss auf das Verhalten und höchstwahrscheinlich auf das Wohlbefinden der Tiere. Hinzu kommt ein wirtschaftlicher Schaden, der für den Züchter oder Halter des Tieres durch die Minderung der Nutzbarkeit des selbigen entsteht. Die Aufklärung der erblichen Komponente an der Entstehung der Erkrankungen hat damit eine große Bedeutung mit dem Ziel die Frequenz des Auftretens der Erkrankungen möglichst zu senken. Grundlage dieser Untersuchungen ist es, Phänotypen zu erkennen und einzuordnen sowie benötigtes Probenmaterial zu sammeln und zu sichern. Die genaue Beschreibung und Einordnung der Phänotypen stellt dabei häufig ein gewisses Problem dar.

Besonders im Fall der Haltung der Tiere in einer größeren Herde und bei progressiv verlaufenden Erkrankungen wie dem BCSE werden Phänotypen häufig erst spät erkannt und

genaue Angaben über das Manifestationsalter und den Verlauf der Erkrankung können nicht eindeutig gemacht werden. Eine genaue Einordnung und Bestimmung des Phänotyps ist damit schwer möglich und eventuell auftretende Abstufungen und Unterschiede im Verlauf der Erkrankung können nicht gemacht werden. Hinzu kommt bei der Betrachtung der Erkrankung BCSE des Rindes, dass potentiell erkrankte Tiere wahrscheinlich aufgrund von Verhaltensauffälligkeiten die Herde verlassen müssen und eine genaue Betrachtung der Augen im Zweifelsfall überhaupt nicht stattfindet. Durch diesen Umstand könnte es sein, dass sehr viele Fälle der Erkrankung nicht registriert und dokumentiert werden oder überhaupt bekannt sind. Züchter und Halter müssen über die Erkrankung informiert sein, um den Phänotypen erkennen und melden zu können, damit entsprechend Proben und Informationen für jeweilige Untersuchungen gesammelt werden könnten.

Bei der equinen Mikrophthalmie handelt es sich um eine kongenital auftretende Erkrankung, die je nach Ausprägungsgrad deutlich zu erkennen und einzuordnen ist. Dennoch kann es im Fall von nur gering ausgeprägten Phänotypen, also nur leicht verkleinerten und gegebenenfalls sehfähigen Augen dazu kommen, dass möglicherweise erkrankte Tiere nicht als solche erkannt werden. Eine eingehende Untersuchung der Augen durch eine entsprechend geschulte Person aller Fohlen könnte sinnvoll sein. Von besonderer Wichtigkeit wäre hier die Transparenz und Zusammenarbeit der Züchter und Besitzer der Tiere in Bezug auf die jeweilige Dokumentation der Befunde. Auch im Fall der equinen Mikrophthalmie ist es so, dass Züchter und Besitzer über die Erkrankung informiert sein müssen, um den Phänotypen erkennen zu können. Im Hinblick auf die in dieser Dissertation bearbeiteten Datengrundlage, scheint es besonders in der Pferdezucht wichtig zu sein, über potentiell erbliche Erkrankungen zu informieren, damit Risikoanpaarungen vermieden werden und die Frequenz des Auftretens der Erkrankung gesenkt werden kann.

Die Bekämpfung auftretender Erbfehler in den Nutztierpopulationen kann sehr gut durch geeignete genetische Tests erfolgen. Tiere, welche Teil der Zuchtpopulation sind oder werden sollen können so untersucht und dem Ergebnis entsprechend eingesetzt oder ausgeschlossen werden. Auf diese Weise wird die Frequenz auftretender erblicher Erkrankungen gesenkt. Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten erblichen Augenerkrankungen konnten bisher keine eindeutig kausal beteiligten Gene identifiziert und damit keine entsprechenden Testverfahren entwickelt werden. Um die Frequenz des Auftretens dieser zwei Erkrankungen zu senken ist

ein konsequentes Handeln der Züchter, Besitzer und Zuchtverbände notwendig. Im Fall des BCSE kann die Erkrankung in vielen Fällen erst zu einem Zeitpunkt auftreten, zu dem das betroffene Tier bereits Teil der Zuchtpopulation ist. Die entsprechenden Nachkommen sind besonders zu beobachten und gegebenenfalls von der Zuchtpopulation auszuschließen, um eine weitere Verbreitung der Erkrankung zu verhindern. Unilateral von der equinen Mikrophthalmie betroffene Stuten sind in der Vergangenheit als Zuchtstuten eingetragen worden. Vermutlich da man von umweltbedingten, nicht erblichen Ursachen für die Erkrankung ausgegangen ist.

Ein genaues Monitoring potentieller Zuchttiere in beiden Spezies ist notwendig, um Züchter und Besitzer über möglicherweise vorliegende erbliche Erkrankungen zu informieren und die von solchen Erkrankungen betroffenen Tiere aus der Zuchtpopulation auszuschließen.

Die Sammlung und Zusammenstellung geeigneter Datengrundlagen stellt eine besondere Herausforderung dar. Die Zusammenarbeit der Tierhalter, Züchter und Zuchtverbände mit den jeweiligen Forschenden ist von großer Bedeutung. Auch eine möglichst zeitnahe Bearbeitung der Proben und Daten sowie die Zusammenarbeit zwischen den Personen, die diese sammeln und denen, die sie bearbeiten, reduzieren potentiell mögliche Fehlerquellen, welche die Ergebnisse beeinflussen könnten.

5 Allgemeine Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zwei unterschiedliche erbliche Erkrankungen der Augen untersucht. Der bilaterale konvergente Strabismus mit Exophthalmus (BCSE) bei Tieren der Rasse Holstein-Rind sowie die equine Mikrophthalmie. Ziel der Untersuchungen war es, die genetische Architektur der Erkrankungen herauszuarbeiten, den Erbgang zu verstehen und eventuell kausale Gene zu identifizieren. Mit dem möglichen langfristigen Ziel genetische Testverfahren zu entwickeln, um potentielle Merkmalsträger aus der Zuchtpopulation ausschließen zu können und die Frequenz des Auftretens der Erkrankungen zu senken.

Im Fall des BCSE des Holstein-Rindes konnte kein eindeutig kausales Gen, welches für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich ist, gefunden werden. Die Ergebnisse vorangegangener Studien an Tieren der Rasse Braunvieh konnten mittels einer durchgeführten GWAS nicht reproduziert werden. Es konnten für Tiere dieser Rasse keine signifikant mit dem Auftreten der Erkrankung assoziierten Genomregionen gefunden werden. Eine Kandidatengenanalyse des Gens *SPG7* auf BTA 18 an einer Stichprobe von Tieren der Rasse Holstein zeigte keinerlei strukturelle Veränderungen des Gens, die auf eine Beteiligung dieses Gens an der Entstehung der Erkrankung schließen lassen könnten. Hier ist allerdings zu beachten, dass nur die codierenden Bereiche des Gens untersucht wurden. Eine Beteiligung der regulatorischen Bereiche des Gens ist also nicht auszuschließen. Die Ergebnisse der GWAS auf Basis einer Datengrundlage nach Imputation an Tieren der Rasse Holstein zeigte keinerlei mit dem Auftreten der Erkrankung assoziierte SNPs auf BTA 18. Daher scheint eine Beteiligung des Gens *SPG7* eher unwahrscheinlich. Die durchgeführte GWAS auf Basis der Datengrundlage nach Imputation zeigte signifikant assoziierte SNPs auf BTA 2, 12 und 17. Signifikant assoziierte SNPs liegen innerhalb des Gens *ABCC4* sowie angrenzend an die Gene *NCOR2* und *DNAJC3*. *NCOR2* konnte bereits mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, weitere Untersuchungen des Gens an Daten betroffener Tiere sind notwendig, um eine mögliche Beteiligung an der Entstehung der Erkrankung zu untersuchen. Durchgeführte histopathologische Untersuchungen zweier betroffener Tiere zeigten, dass neurodegenerative Prozesse eine Ursache für die Entstehung von BCSE sein könnten. Die neuropathologische Untersuchung der entsprechenden Nerven und Hirnareale an einem betroffenen Tier konnte allerdings keine morphologischen Veränderungen nachweisen.

Weitere histopathologische und neuropathologische Untersuchungen betroffener Tiere sind notwendig, um gegebenenfalls unterschiedliche Phänotypen herauszuarbeiten und die Erkrankung genauer einordnen zu können, was gegebenenfalls die Suche nach zugrundeliegenden Vererbungswegen beeinflussen könnte. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass es sich bei der Entstehung von BCSE bei Tieren der Rasse Holstein wahrscheinlich um ein komplexes genetisches Geschehen handelt und dass die Entstehung der Erkrankung nicht auf ein kausales Einzelgen zurückzuführen ist.

Im Fall des gehäuften Auftretens der equinen Mikrophthalmie in einer Halbgeschwister-Familienstruktur eines Hengstes des Holsteiner Verbandes konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation ebenfalls kein eindeutig kausales Gen identifiziert werden. Eine durchgeführte GWAS auf Grundlage von Daten von 45 Pferden (11 betroffene und 34 nicht betroffene) konnte keine genomweit signifikant mit dem Auftreten der Erkrankung assoziierten SNPs nachweisen. Auf dem Chromosomen 8 konnten jedoch vier chromosomenweit signifikant assoziierte SNPs gefunden werden. Einer der vier signifikant assoziierten SNPs liegt in der Nähe des Gens *CDH2*. Dieses Gen spielt eine wichtige Rolle in der Embryonal- und Augenentwicklung. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden ausgewählte Varianten in den codierenden Bereichen des Gens sequenziert und untersucht. Die Ergebnisse konnten jedoch nicht auf eine Beteiligung dieser Varianten an der Entstehung der Erkrankung schließen lassen. Weitere Untersuchungen des Gens, auch in den regulatorischen Bereichen, wären sinnvoll, um eine mögliche Beteiligung von *CDH2* ausschließen oder aber bestätigen zu können. Eine durchgeführte Kandidatengenanalyse des *RAX* Gens auf Chromosomen 8 konnte zwei strukturelle Varianten identifizieren, die eventuell mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert sein könnten. Da die Ergebnisse nicht über alle Tiere hin konsistent waren, kann davon ausgegangen werden, dass diese Varianten nicht als alleinig ursächlich für das Auftreten der Erkrankung anzusehen sind. Die Beteiligung mehrerer Gene und auch regulatorischer Regionen im Genom sowie eine geringe Genotyp-Phänotyp-Korrelation scheint wahrscheinlich. Auch ist es möglich, dass Faktoren wie eine unvollständige Penetranz und eine variable Expressivität die Identifikation kausaler Genvarianten erschweren.

6 General summary

In the context of the present thesis, two different hereditary diseases of the eyes were investigated. Bilateral convergent strabismus with exophthalmos (BCSE) in Holstein cattle and equine microphthalmia. The aim of the studies was to understand the genetic architecture of the diseases as well as the mode of inheritance and to identify possible causal genes. The long-term intention was to develop genetic testing procedures to exclude potential trait carriers from the breeding population and to reduce the frequency of the occurrence of the diseases.

In the case of BCSE in Holstein cattle, no definite causal gene responsible for the development of the disease could be found. The results of previous studies on animals of the Brown Swiss breed could not be reproduced by means of a performed GWAS. No genome regions significantly associated with the occurrence of the disease could be found in animals of this breed. A candidate gene analysis of the gene *SPG7* on BTA 18 in a sample of animals of the Holstein cattle breed showed no structural changes in the gene, which could indicate involvement of this gene in the development of the disease. However, it should be noted that only the coding regions of the gene were examined. Therefore, an involvement of the regulatory regions of the gene cannot be excluded. The results of the GWAS based on data after imputation in Holstein cattle, showed no SNPs on BTA 18 associated with the occurrence of the disease. Therefore, an involvement of the gene *SPG7* seems rather unlikely. The performed GWAS based on the data after imputation showed significantly associated SNPs on BTA 2, 12 and 17. The significantly associated SNPs are located within the gene *ABCC4* as well as adjacent to the *NCOR2* and *DNAJC3* genes. *NCOR2* has already been associated with neurodegenerative diseases, further studies of the gene in data derived from affected animals are necessary to investigate a possible involvement in the development of the disease. Histopathological examinations of two affected animals showed that neurodegenerative processes could be a cause for the development of BCSE. However, the neuropathological examination of the respective nerves and brain areas in an affected animal could not reveal any morphological changes. Further histopathological and neuropathological examinations of affected animals are necessary to identify possibly different phenotypes and to be able to classify the disease more precisely, which could impact on the search for underlying hereditary traits. The results of the conducted studies show that the development of BCSE in Holstein

cattle is probably a complex genetic event and that the development of the disease is not due to a single causal gene.

In the case of an increased occurrence of equine microphthalmia in a half sibling family structure of a stallion of the Holsteiner Verband no definite causal gene could be identified in the present thesis as well. A performed GWAS based on data of 45 horses (11 affected and 34 unaffected) could not detect any genome-wide significantly with the occurrence of the disease associated SNPs. However, four chromosome-wide significantly with the occurrence of the disease associated SNPs were found on chromosome 8. One of the four significantly associated SNPs is located near the gene *CDH2*. This gene plays an important role in embryonic and eye development. Based on these findings, a selection of variants in the coding regions of the gene were sequenced and studied. The results did not suggest that these variants are involved in the development of the disease. Further investigations of the gene, also in its regulatory regions, would be advisable in order to exclude or confirm a possible involvement of *CDH2*. A performed candidate gene analysis of the *RAX* gene on chromosome 8 could identify two variants that might be associated with the occurrence of the disease. Since the results were not consistent across all animals, it can be assumed that these variants cannot be considered as the only causative factor for the occurrence of the disease. The involvement of multiple genes and also regulatory regions in the genome as well as a low genotype-phenotype correlation seems likely. It is also possible that factors such as incomplete penetrance and variable expressivity complicate the identification of causal gene variants.

7 Literaturverzeichnis

Aldahmesh, M. A.; Khan, A. O.; Hijazi, H.; Alkuraya, F. S. (2013a): Homozygous truncation of SIX6 causes complex microphthalmia in humans. In: *Clinical genetics* 84 (2), S. 198–199. DOI: 10.1111/cge.12046.

Aldahmesh, M. A.; Khan, A. O.; Hijazi, H.; Alkuraya, F. S. (2013b): Mutations in ALDH1A3 cause microphthalmia. In: *Clinical genetics* 84 (2), S. 128–131. DOI: 10.1111/cge.12184.

Aldahmesh, Mohammed A.; Khan, Arif O.; Mohamed, Jawahir; Alkuraya, Fowzan S. (2011): Novel recessive BFSP2 and PITX3 mutations: insights into mutational mechanisms from consanguineous populations. In: *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 13 (11), S. 978–981. DOI: 10.1097/GIM.0b013e31822623d5.

Ammar, Tamer H. A.; Ismail, Somaia; Mansour, Ossama Abd Al-Motaal; El-Shafey, Mostafa M.; Doghish, Ahmed S.; Kamal, Ahmad M.; Abdel-Salam, Ghada M. H. (2017): Genetic analysis of SOX2 and VSX2 genes in 27 Egyptian families with anophthalmia and microphthalmia. In: *Ophthalmic genetics* 38 (5), S. 498–500. DOI: 10.1080/13816810.2017.1279184.

Anand, Deepti; Agrawal, Smriti A.; Slavotinek, Anne; Lachke, Salil A. (2018): Mutation update of transcription factor genes FOXE3, HSF4, MAF, and PITX3 causing cataracts and other developmental ocular defects. In: *Human mutation* 39 (4), S. 471–494. DOI: 10.1002/humu.23395.

Bardakjian, Tanya; Weiss, Avery; Schneider, Adele (1993): GeneReviews®.

Microphthalmia/Anophthalmia/Coloboma Spectrum. Hg. v. Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, Karen Stephens und Anne Amemiya. Seattle (WA).

Becker, D.; Tetens, J.; Brunner, A.; Burstel, D.; Ganter, M.; Kijas, J.; Drogemuller, C. (2010): Microphthalmia in Texel sheep is associated with a missense mutation in the paired-like homeodomain 3 (PITX3) gene. In: *PloS one* 5 (1), e8689. DOI: 10.1371/journal.pone.0008689.

Berthier, Joseph; Arnion, Hélène; Saint-Marcoux, Franck; Picard, Nicolas (2019): Multidrug resistance-associated protein 4 in pharmacology: Overview of its contribution to

pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics. In: *Life sciences* 231, S. 116540. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.06.015.

Bhandari, Ramanath; Ferri, Sara; Whittaker, Beatrice; Liu, Margaret; Lazzaro, Douglas R. (2011): Peters anomaly: review of the literature. In: *Cornea* 30 (8), S. 939–944. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31820156a9.

Browning, Brian L.; Zhou, Ying; Browning, Sharon R. (2018): A One-Penny Imputed Genome from Next-Generation Reference Panels. In: *American journal of human genetics* 103 (3), S. 338–348. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.07.015.

Bucelli, Robert C.; Lee, Michael S.; McClelland, Collin M. (2016): Chronic Progressive External Ophthalmoplegia in the Absence of Ptosis. In: *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* 36 (3), S. 270–274. DOI: 10.1097/WNO.0000000000000384.

Burchfield, Jana S.; Li, Qingtian; Wang, Helen Y.; Wang, Rong-Fu (2015): JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 67, S. 148–157. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.07.006.

Casey, Jillian; Kawaguchi, Riki; Morrissey, Maria; Sun, Hui; McGettigan, Paul; Nielsen, Jens E. et al. (2011): First implication of STRA6 mutations in isolated anophthalmia, microphthalmia, and coloboma: a new dimension to the STRA6 phenotype. In: *Human mutation* 32 (12), S. 1417–1426. DOI: 10.1002/humu.21590.

Charon, K. M.; Lipka, K. R. (2015): The Effect of a Coat Colour-Associated Genes Polymorphism on Animal Health – A Review. In: *Annals of Animal Science* 15 (1). DOI: 10.2478/aoas-2014-0066.

Chassaing, N.; Causse, A.; Vigouroux, A.; Delahaye, A.; Alessandri, J-L; Boespflug-Tanguy, O. et al. (2014): Molecular findings and clinical data in a cohort of 150 patients with anophthalmia/microphthalmia. In: *Clinical genetics* 86 (4), S. 326–334. DOI: 10.1111/cge.12275.

Chassaing, Nicolas; Davis, Erica E.; McKnight, Kelly L.; Niederriter, Adrienne R.; Causse, Alexandre; David, Véronique et al. (2016): Targeted resequencing identifies PTCH1 as a major contributor to ocular developmental anomalies and extends the SOX2 regulatory network. In: *Genome research* 26 (4), S. 474–485. DOI: 10.1101/gr.196048.115.

- Chen, J. D.; Evans, R. M. (1995): A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. In: *Nature* 377 (6548), S. 454–457. DOI: 10.1038/377454a0.
- Chow, R. L.; Lang, R. A. (2001): Early eye development in vertebrates. In: *Annual review of cell and developmental biology* 17, S. 255–296. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.255.
- Deschauer, M.; Müller, T.; Dreha, S.; Zierz, S. (2001): Familiäre mitochondriale chronisch progressive externe Ophthalmoplegie. Fünf Familien mit unterschiedlicher Genetik. In: *Der Nervenarzt* 72 (2), S. 122–129. DOI: 10.1007/s001150050724.
- Deschauer, M.; Zierz, S. (2003): Defekte der intergenomischen Kommunikation: Mutationen der Kern-DNA und multiple Deletionen der mitochondrialen DNA bei chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie. In: *Akt Neurol* 30 (3), S. 103–106. DOI: 10.1055/s-2003-38271.
- Deschauer, Marcus (2003): Mitochondriale Enzephalomyopathien. In: *psychoneuro* 29 (3), S. 108–112. DOI: 10.1055/s-2003-38712.
- Distl, O. (1993): Analysis of pedigrees in dairy cattle segregating for bilateral strabismus with exophthalmus. In: *Journal of Animal Breeding and Genetics* 110, S. 393–400.
- Distl, O.; Gerst, M. (2000): Association Analysis between Bilateral Convergent Strabismus with Exophthalmus and Milk Production Traits in Dairy Cattle. In: *J Vet Med Series A* 47 (1), S. 31–36. DOI: 10.1046/j.1439-0442.2000.00259.x.
- Distl, O.; Scheider, A. (1994): Ein ungewöhnlicher Augendefekt beim Highland Cattle: Divergierendes unilaterales Schielen. In: *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 101 (5), S. 202–203.
- Distl, O.; Wenninger, A.; Kräusslich, H. (1991): Inheritance of convergent strabismus with exophthalmus in cattle. In: *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 98, S. 354–356.
- Dolk, H.; Busby, A.; Armstrong, B. G.; Walls, P. H. (1998): Geographical variation in anophthalmia and microphthalmia in England, 1988-94. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 317 (7163), 905-9; discussion 910. DOI: 10.1136/bmj.317.7163.905.
- Dziezyc, J.; KERN, T. J.; WOLF, E. (1983): Microphthalmia in a foal. In: *Equine Veterinary Journal* 15 (S2), S. 15–17. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb04548.x.

Ehrlich, D.; Stuchbery, J.; Zappia, J. (1989): Morphology of congenital microphthalmia in chicks (*Gallus gallus*). In: *Journal of morphology* 199 (1), S. 1–13. DOI: 10.1002/jmor.1051990102.

Fink, S.; Mömke, S.; Distl, O. (2012): PLXNC1 and RDH13 associated with bilateral convergent strabismus with exophthalmus in German Brown cattle 2012. In: *Molecular vision* 18, S. 2229–2240.

Fink, S.; Mömke, S.; Wöhlke, A.; Distl (2008): Genes on bovine chromosome 18 associated with bilateral convergent strabismus with exophthalmus in German Brown cattle. In: *Molecular vision* 14, S. 1737–1751.

Flury, C.; Tapio, M.; Sonstegard, T.; Drögemüller, C.; Leeb, T.; Simianer, H. et al. (2010): Effective population size of an indigenous Swiss cattle breed estimated from linkage disequilibrium. In: *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift für Tierzucht und Zuchtungsbiologie* 127 (5), S. 339–347. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2010.00862.x.

Gelatt, K. N.; McGill, L. D. (1973): Clinical characteristics of microphthalmia with colobomas of the Australian Shepherd Dog. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 162 (5), S. 393–396.

Gelatt, Kirk N. (Hg.) (2014): Essentials of veterinary ophthalmology. Third edition. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/9781118910337>.

Gene Codes Corporation (2017): Sequencher DNS sequence analysis software. Version 5.4.6. Ann Arbor MI USA: Sequencher. Online verfügbar unter <http://www.genecodes.com>.

Gerst, M.; Distl, O. (1997): Einflüsse auf die Dissemination des bilateralen Strabismus convergens mit Exophthalmus beim Rind. In: *Archiv für Tierzucht* 40, S. 401–412.

Gerth-Kahlert, Christina; Williamson, Kathleen; Ansari, Morad; Rainger, Jacqueline K.; Hingst, Volker; Zimmermann, Theodor et al. (2013): Clinical and mutation analysis of 51 probands with anophthalmia and/or severe microphthalmia from a single center. In: *Molecular genetics & genomic medicine* 1 (1), S. 15–31. DOI: 10.1002/mgg3.2.

Gibbs, Richard A.; Taylor, Jeremy F.; van Tassell, Curtis P.; Barendse, William; Eversole, Kellye A.; Gill, Clare A. et al. (2009): Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic

- structure of cattle breeds. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5926), S. 528–532. DOI: 10.1126/science.1167936.
- Gilbert, Scott F.; Tyler, Mary S.; Kozlowski, Ronald N. (2003): *Developmental biology*. 7. ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Assoc.
- Gilger, B. C. (2011): *Equine ophthalmology*. 2nd ed. St. Louis Mo.: Elsevier Saunders.
- Graw, Jochen (2003): The genetic and molecular basis of congenital eye defects. In: *Nature reviews. Genetics* 4 (11), S. 876–888. DOI: 10.1038/nrg1202.
- Grewal, Gurpreet Kaur; Kukal, Samiksha; Kanojia, Neha; Saso, Luciano; Kukreti, Shrikant; Kukreti, Ritushree (2017): Effect of Oxidative Stress on ABC Transporters: Contribution to Epilepsy Pharmacoresistance. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (3). DOI: 10.3390/molecules22030365.
- GSL Biotech (2020): SnapGene® software. Online verfügbar unter <https://www.snapgene.com>.
- Hagger, C. (2005): Estimates of genetic diversity in the brown cattle population of Switzerland obtained from pedigree information. In: *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift für Tierzucht und Zuchtungsbiologie* 122 (6), S. 405–413. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2005.00552.x.
- Hauke, G. (2003): Candidate gene analysis for bilateral convergent strabismus with exophthalmus in German Brown cattle. Inaugural-Dissertation. School of Veterinary Medicine Hannover, Hannover. Institute of Animal Breeding and Genetics.
- Hayes, Ben J.; Daetwyler, Hans D. (2019): 1000 Bull Genomes Project to Map Simple and Complex Genetic Traits in Cattle. Applications and Outcomes. In: *Annual review of animal biosciences* 7, S. 89–102. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-115024.
- Hug, Petra; Anderegg, Linda; Dürig, Nicole; Lepori, Vincent; Jagannathan, Vidhya; Spiess, Bernhard et al. (2019): A SIX6 Nonsense Variant in Golden Retrievers with Congenital Eye Malformations. In: *Genes* 10 (6). DOI: 10.3390/genes10060454.
- Jagannathan, V.; Gerber, V.; Rieder, S.; Tetens, J.; Thaller, G.; Drögemüller, C.; Leeb, T. (2019): Comprehensive characterization of horse genome variation by whole-genome sequencing of 88 horses. In: *Animal genetics* 50 (1), S. 74–77. DOI: 10.1111/age.12753.

- Jepsen, Kristen; Solum, Derek; Zhou, Tianyuan; McEvilly, Robert J.; Kim, Hyun-Jung; Glass, Christopher K. et al. (2007): SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron. In: *Nature* 450 (7168), S. 415–419. DOI: 10.1038/nature06270.
- Jubb, T. F. (1988): Nervous disease associated with coccidiosis in young cattle. In: *Australian veterinary journal* 65 (11), S. 353–354. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1988.tb14263.x.
- Kaukonen, Maria; Woods, Sean; Ahonen, Saija; Lemberg, Seppo; Hellman, Maarit; Hytönen, Marjo K. et al. (2018): Maternal Inheritance of a Recessive RBP4 Defect in Canine Congenital Eye Disease. In: *Cell reports* 23 (9), S. 2643–2652. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.118.
- Kim, Kyung Woo; Kusuhara, Sentaro; Katsuyama-Yoshikawa, Atsuko; Nobuyoshi, Sho; Kitamura, Megumi; Mori, Sotaro et al. (2021): Changes in Gene Expression Profiling and Phenotype in Aged Multidrug Resistance Protein 4-Deficient Mouse Retinas. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (3). DOI: 10.3390/antiox10030455.
- König, Horst Erich; Liebich, Hans-Georg (Hg.) (2005): Anatomie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; Ausgabe in einem Band. 3., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer.
- Kornblum, C.; Kunz, W. S.; Klockgether, T.; Roggenkämper, P.; Schröder, R. (2004): Bedeutung der mitochondrialen DNA-Analyse in der Diagnostik der chronisch-progressiven externen Ophthalmoplegie (CPEO). In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 221 (12), S. 1057–1061. DOI: 10.1055/s-2004-813830.
- Latimer, C. A.; WYMAN, M.; HAMILTON, J. (1983): An ophthalmic survey of the neonatal horse. In: *Equine Veterinary Journal* 15 (S2), S. 9–14. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb04547.x.
- Leipold, H. W.; Huston, K. (1968): Congenital syndrome of anophthalmia-microphthalmia with associated defects in cattle. In: *Pathologia veterinaria* 5 (5), S. 407–418. DOI: 10.1177/030098586800500503.
- Lytrivi, Maria; Senée, Valérie; Salpea, Paraskevi; Fantuzzi, Federica; Philippi, Anne; Abdulkarim, Baroj et al. (2021): DNAJC3 deficiency induces β -cell mitochondrial apoptosis and causes syndromic young-onset diabetes. In: *European journal of endocrinology* 184 (3), S. 455–468. DOI: 10.1530/EJE-20-0636.

- Mathers, P. H.; Grinberg, A.; Mahon, K. A.; Jamrich, M. (1997): The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. In: *Nature* 387 (6633), S. 603–607. DOI: 10.1038/42475.
- Matsumiya, Wataru; Kusuhara, Sentaro; Hayashibe, Keiko; Maruyama, Kazuichi; Kusuhara, Hiroyuki; Tagami, Mizuki et al. (2012): Forskolin modifies retinal vascular development in Mrp4-knockout mice. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 53 (13), S. 8029–8035. DOI: 10.1167/iovs.12-10781.
- McClelland, Collin; Manousakis, Georgios; Lee, Michael S. (2016): Progressive External Ophthalmoplegia. In: *Current neurology and neuroscience reports* 16 (6), S. 53. DOI: 10.1007/s11910-016-0652-7.
- McKenna, Aaron; Hanna, Matthew; Banks, Eric; Sivachenko, Andrey; Cibulskis, Kristian; Kernytsky, Andrew et al. (2010): The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. In: *Genome research* 20 (9), S. 1297–1303. DOI: 10.1101/gr.107524.110.
- McLaren, William; Gil, Laurent; Hunt, Sarah E.; Riat, Harpreet Singh; Ritchie, Graham R. S.; Thormann, Anja et al. (2016): The Ensembl Variant Effect Predictor. In: *Genome biology* 17 (1), S. 122. DOI: 10.1186/s13059-016-0974-4.
- Molnar, Maria J.; Kovacs, Gabor G. (2017): Mitochondrial diseases. In: *Handbook of clinical neurology* 145, S. 147–155. DOI: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00010-9.
- Mömke, S.; Fink, S.; Wöhlke, A.; Drögemüller, C.; Distl, O. (2008): Linkage of bilateral convergent strabismus with exophthalmus (BCSE) to BTA5 and BTA18 in German Brown cattle. In: *Animal genetics* 39 (5), S. 544–549. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2008.01771.x.
- Mömke, S. H. (2004): Molecular genetic analysis of bilateral convergent strabismus with exophthalmus in German Brown cattle. Inaugural-Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover. Institut für Tierzucht und Vererbungsforchung.
- Mömke, Stefanie; Distl, Ottmar (2007): Bilateral convergent strabismus with exophthalmus (BCSE) in cattle. An overview of clinical signs and genetic traits. In: *Veterinary journal (London, England : 1997)* 173 (2), S. 272–277. DOI: 10.1016/j.tvjl.2005.11.020.

- Mosier, Derek A.; ENGELMAN, R. W.; CONFER, A. W.; McCARROLL, G. D. (1983): Bilateral multiple congenital ocular defects in Quarterhorse foals. In: *Equine Veterinary Journal* 15 (S2), S. 18–20. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb04549.x.
- Mottis, Adrienne; Mouchiroud, Laurent; Auwerx, Johan (2013): Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. In: *Genes & development* 27 (8), S. 819–835. DOI: 10.1101/gad.214023.113.
- Ni, Wei; Wang, Wei; Hong, Jing; Zhang, Pei; Liu, Cong (2015): A novel histopathologic finding in the Descemet's membrane of a patient with Peters Anomaly: a case-report and literature review. In: *BMC ophthalmology* 15, S. 139. DOI: 10.1186/s12886-015-0131-y.
- Ozon, Z. Alev; Alikasifoglu, Ayfer; Kandemir, Nurgun; Aydin, Busra; Gonc, E. Nazli; Karaosmanoglu, Beren et al. (2020): Novel insights into diabetes mellitus due to DNAJC3-defect: Evolution of neurological and endocrine phenotype in the pediatric age group. In: *Pediatric diabetes* 21 (7), S. 1176–1182. DOI: 10.1111/pedi.13098.
- Park, Dae Hwi; Hong, Sung Jun; Salinas, Ryan D.; Liu, Siyuan John; Sun, Shawn W.; Sgualdino, Jacopo et al. (2014): Activation of neuronal gene expression by the JMJD3 demethylase is required for postnatal and adult brain neurogenesis. In: *Cell reports* 8 (5), S. 1290–1299. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.060.
- Patel, N.; Khan, A. O.; Alsahli, S.; Abdel-Salam, G.; Nowilaty, S. R.; Mansour, A. M. et al. (2018): Genetic investigation of 93 families with microphthalmia or posterior microphthalmos. In: *Clinical genetics* 93 (6), S. 1210–1222. DOI: 10.1111/cge.13239.
- Pfeffer, Gerald; Gorman, Gráinne S.; Griffin, Helen; Kurzawa-Akanbi, Marzena; Blakely, Emma L.; Wilson, Ian et al. (2014): Mutations in the SPG7 gene cause chronic progressive external ophthalmoplegia through disordered mitochondrial DNA maintenance. In: *Brain : a journal of neurology* 137 (Pt 5), S. 1323–1336. DOI: 10.1093/brain/awu060.
- Phanstiel, D. H. (2021): Sushi: Tools for visualizing genomics data. Online verfügbar unter Dphansti@Stanford.Edu.
- Plaisancié, J.; Ceroni, F.; Holt, R.; Zazo Seco, C.; Calvas, P.; Chassaing, N.; Ragge, Nicola K. (2019): Genetics of anophthalmia and microphthalmia. Part 1. Non-syndromic anophthalmia/microphthalmia. In: *Human genetics* 138 (8-9), S. 799–830. DOI: 10.1007/s00439-019-01977-y.

- Plaisancié, Julie; Brémond-Gignac, Dominique; Demeer, Bénédicte; Gaston, Véronique; Verloes, Alain; Fares-Taie, Lucas et al. (2016): Incomplete penetrance of biallelic ALDH1A3 mutations. In: *European journal of medical genetics* 59 (4), S. 215–218. DOI: 10.1016/j.ejmg.2016.02.004.
- Pontoriero, Giuseppe F.; Smith, April N.; Miller, Leigh-Anne D.; Radice, Glenn L.; West-Mays, Judith A.; Lang, Richard A. (2009): Co-operative roles for E-cadherin and N-cadherin during lens vesicle separation and lens epithelial cell survival. In: *Developmental biology* 326 (2), S. 403–417. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.10.011.
- Purcell, Shaun; Neale, Benjamin; Todd-Brown, Kathe; Thomas, Lori; Ferreira, Manuel A. R.; Bender, David et al. (2007): PLINK. A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. In: *American journal of human genetics* 81 (3), S. 559–575. DOI: 10.1086/519795.
- Qanbari, S.; Pimentel, E. C. G.; Tetens, J.; Thaller, G.; Lichtner, P.; Sharifi, A. R.; Simianer, H. (2010): The pattern of linkage disequilibrium in German Holstein cattle. In: *Animal genetics* 41 (4), S. 346–356. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2009.02011.x.
- R Core Team (2020): R: A Language and Environment for Statistical Computing. Version 3.4.2.
- Rainger, Joe; Pehlivan, Davut; Johansson, Stefan; Bengani, Hemant; Sanchez-Pulido, Luis; Williamson, Kathleen A. et al. (2014): Monoallelic and biallelic mutations in MAB21L2 cause a spectrum of major eye malformations. In: *American journal of human genetics* 94 (6), S. 915–923. DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.05.005.
- Regan, W. M.; Gregory, P. W.; Mead, S. W. (1944): Hereditary strabismus in Jersey cattle. In: *The Journal of Heredity* 35 (8), S. 233–234.
- Reis, Linda M.; Houssin, Nathalie S.; Zamora, Carlos; Abdul-Rahman, Omar; Kalish, Jennifer M.; Zackai, Elaine H. et al. (2019): Novel variants in CDH2 are associated with a new syndrome including Peters anomaly. In: *Clinical genetics*. DOI: 10.1111/cge.13660.
- Richardson, C.; Smith, T.; Schaefer, A.; Turnbull, D.; Griffiths, P. (2005): Ocular motility findings in chronic progressive external ophthalmoplegia. In: *Eye (London, England)* 19 (3), S. 258–263. DOI: 10.1038/sj.eye.6701488.
- Richardson, Rose; Sowden, Jane; Gerth-Kahlert, Christina; Moore, Anthony T.; Moosajee, Mariya (2017): Clinical utility gene card for. Non-Syndromic Microphthalmia Including Next-

Generation Sequencing-Based Approaches. In: *European journal of human genetics : EJHG* 25 (4). DOI: 10.1038/ejhg.2016.201.

Riera, Marina; Wert, Ana; Nieto, Isabel; Pomares, Esther (2017): Panel-based whole exome sequencing identifies novel mutations in microphthalmia and anophthalmia patients showing complex Mendelian inheritance patterns. In: *Molecular genetics & genomic medicine* 5 (6), S. 709–719. DOI: 10.1002/mgg3.329.

Roberts, Steven M. (1992): Congenital Ocular Anomalies. In: *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 8 (3), S. 459–478. DOI: 10.1016/S0749-0739(17)30436-4.

Roos, L.; Hinrichs, D.; Nissen, T.; Krieter, J. (2015): Investigations into genetic variability in Holstein horse breed using pedigree data. In: *Livestock Science* 177, S. 25–32. DOI: 10.1016/j.livsci.2015.04.013.

Russel, Frans G. M.; Koenderink, Jan B.; Masereeuw, Rosalinde (2008): Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. In: *Trends in pharmacological sciences* 29 (4), S. 200–207. DOI: 10.1016/j.tips.2008.01.006.

Salomon, Franz-Viktor; Geyer, Hans; Gille, Uwe (Hg.) (2008): Anatomie für die Tiermedizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Schnorr, Bertram; Kressin, Monika (2006): Embryologie der Haustiere. Ein Kurzlehrbuch. 5., neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke. Online verfügbar unter http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?id=2787321&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.

Schoser, Benedikt G. H. (2007): Ocular myositis: diagnostic assessment, differential diagnoses, and therapy of a rare muscle disease - five new cases and review. In: *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 1 (1), S. 37–42.

Schutte, J. G.; van den Ingh, T. S. (1997): Microphthalmia, brachygnathia superior, and palatocheiloschisis in a foal associated with griseofulvin administration to the mare during early pregnancy. In: *The Veterinary quarterly* 19 (2), S. 58–60. DOI: 10.1080/01652176.1997.9694741.

Schütz-Hänke, W.; Stöber, M.; Drommer, W. (1979): Klinische, genealogische und pathomorphologische Untersuchungen an schwarzbunten Rindern mit beiderseitigem exophthalmisch-konvergierendem Schielen. In: *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 86, S. 185–191.

- Shastry, B. S.; Reddy, V. N. (1994): Studies on congenital hereditary cataract and microphthalmia of the miniature schnauzer dog. In: *Biochemical and biophysical research communications* 203 (3), S. 1663–1667. DOI: 10.1006/bbrc.1994.2377.
- Sim, Ngak-Leng; Kumar, Prateek; Hu, Jing; Henikoff, Steven; Schneider, Georg; Ng, Pauline C. (2012): SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. In: *Nucleic acids research* 40 (Web Server issue), W452-7. DOI: 10.1093/nar/gks539.
- Slavotinek, A. M.; Garcia, S. T.; Chandratillake, G.; Bardakjian, T.; Ullah, E.; Wu, D. et al. (2015): Exome sequencing in 32 patients with anophthalmia/microphthalmia and developmental eye defects. In: *Clinical genetics* 88 (5), S. 468–473. DOI: 10.1111/cge.12543.
- Somes, R. G. (1992): Microphthalmia-4: a sex-influenced inherited eye condition of the chicken. In: *The Journal of Heredity* 83 (2), S. 152–155. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111178.
- Synofzik, Matthis; Haack, Tobias B.; Kopajtich, Robert; Gorza, Matteo; Rapaport, Doron; Greiner, Markus et al. (2014): Absence of BiP co-chaperone DNAJC3 causes diabetes mellitus and multisystemic neurodegeneration. In: *American journal of human genetics* 95 (6), S. 689–697. DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.10.013.
- Takeichi, M. (1988): The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. In: *Development (Cambridge, England)* 102 (4), S. 639–655.
- Thiedemann, Fritz (um 1989): Das Spring-Pferd. 3. Aufl. Lage-Lippe: Ed. Haberbeck.
- Tsai, Chih-Cheng; Kao, Hung-Ying; Mizutani, Akifumi; Banayo, Ester; Rajan, Harini; McKeown, Michael; Evans, Ronald M. (2004): Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (12), S. 4047–4052. DOI: 10.1073/pnas.0400615101.
- van Binsbergen, Rianne; Bink, Marco Cam; Calus, Mario Pl; van Eeuwijk, Fred A.; Hayes, Ben J.; Hulsege, Ina; Veerkamp, Roel F. (2014): Accuracy of imputation to whole-genome sequence data in Holstein Friesian cattle. In: *Genetics, selection, evolution : GSE* 46, S. 41. DOI: 10.1186/1297-9686-46-41.

- Verband der Züchter des Holsteiner Pferdes e.V. (2019): Satzung des Verbandes der Züchter des Holsteiner Pferdes e.V. Online verfügbar unter <https://www.holsteiner-verband.de/de/verband/satzung>.
- Verma, Amit S.; Fitzpatrick, David R. (2007): Anophthalmia and microphthalmia. In: *Orphanet journal of rare diseases* 2, S. 47. DOI: 10.1186/1750-1172-2-47.
- Visuttijai, Kittichate; Hedberg-Oldfors, Carola; Lindgren, Ulrika; Nordström, Sara; Elíasdóttir, Ólöf; Lindberg, Christopher; Oldfors, Anders (2021): Progressive external ophthalmoplegia associated with novel MT-TN mutations. In: *Acta neurologica Scandinavica* 143 (1), S. 103–108. DOI: 10.1111/ane.13339.
- Vogt, C. (2000): Untersuchungen zum bilateralen Strabismus convergens mit Exophthalmus (BCSE) beim Deutschen Braunvieh. Inaugural-Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover. Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- Warburg, Mette (2009): Update of Sporadic Microphthalmos and Coloboma Non-Inherited Anomalies Dedicated to Barrie Jay. In: *Ophthalmic Paediatrics and Genetics* 13 (2), S. 111–122. DOI: 10.3109/13816819209087611.
- Wiedemar, Natalie; Drögemüller, Cord (2014): A 19-Mb de novo deletion on BTA 22 including MITF leads to microphthalmia and the absence of pigmentation in a Holstein calf. In: *Animal genetics* 45 (6), S. 868–870. DOI: 10.1111/age.12213.
- Willam, Alfons; Simianer, Henner (2011): Tierzucht. 1. Aufl. Stuttgart: Ulmer (UTB Argrarwissenschaften, 3526). Online verfügbar unter <http://www.utb-studi-e-book.de/9783838535265>.
- Witt, Martin (2007): Anatomie - GK1. + IMPP-Fragen online 2002 - heute. Berlin: Springer (Springer E-book Collection).
- Yang, Jian; Lee, S. Hong; Goddard, Michael E.; Visscher, Peter M. (2011): GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. In: *American journal of human genetics* 88 (1), S. 76–82. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.11.011.
- Ye, Jian; Coulouris, George; Zaretskaya, Irena; Cutcutache, Ioana; Rozen, Steve; Madden, Thomas L. (2012): Primer-BLAST. A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In: *BMC bioinformatics* 13, S. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

Ye, Ming; Berry-Wynne, Karyn M.; Asai-Coakwell, Mika; Sundaresan, Periasamy; Footz, Tim; French, Curtis R. et al. (2010): Mutation of the bone morphogenetic protein GDF3 causes ocular and skeletal anomalies. In: *Human molecular genetics* 19 (2), S. 287–298. DOI: 10.1093/hmg/ddp496.

Zagozewski, J. L.; Zhang, Q.; Eisenstat, D. D. (2014): Genetic regulation of vertebrate eye development. In: *Clinical genetics* 86 (5), S. 453–460. DOI: 10.1111/cge.12493.

Zoghbi, H. Y.; Orr, H. T. (2000): Glutamine repeats and neurodegeneration. In: *Annual review of neuroscience* 23, S. 217–247. DOI: 10.1146/annurev.neuro.23.1.217.

VI. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Jens Tetens** für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung sowie für seine Geduld und sein Verständnis in den vergangenen Jahren bedanken.

Bei **Herrn Prof. Dr. Cord Drögemüller** bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats sowie für die Beratung und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Hummel möchte ich für die Übernahmen des Prüfungsbeisitzes danken.

Bei der **H. Wilhelm Schaumann Stiftung** bedanke ich mich für die finanzielle Förderung dieses Projektes.

Ein ganz besonders großes Dankeschön gilt **Dr. Clemens Falker-Gieske** für seine Unterstützung, Beratung und Hilfe!

Ich möchte mich ganz herzlich bei **allen Mitarbeitern der Abteilung**, die in irgendeiner Form Arbeiten für mich übernommen haben bedanken. **Clemens, Isabel** und **Hannah** vielen Dank für euren Einsatz im Labor.

Carina, danke, dass du dein Büro mit mir geteilt hast, ich wäre sehr gerne häufiger dort gewesen.

Liebe **Julia**, vielen Dank für deine Unterstützung und fürs häufige, schnelle, Lesen zu jeder Zeit.

Großer Dank gilt **meinen Eltern** für die nicht endende Unterstützung und dafür, dass sie auch dieses Projekt mitgetragen haben.

Sebastian, danke für die große Unterstützung, den Rückhalt und alles, was du für unsere Familie machst.

Mathilda und **Carl**, ihr wart wohl am nächsten dran. Es ist sehr schön, dass es Euch gibt. Euch widme ich diese Arbeit.

VII. Eidesstattliche Erklärung

1. Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits anderen Prüfungsbehörden vorgelegen hat.

Weiter erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Hochschule um einen Doktorgrad beworben habe.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

2. Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass diese Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)