

# Quantitative trait loci (QTL) für die Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber *Actinobacillus pleuropneumoniae* beim Schwein

Natalie Bertsch



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.** beim Fachbereich  
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine  
Professur für Schweinekrankheiten (Innere Medizin und Chirurgie)  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

**Quantitative trait loci (QTL) für die Resistenz/Empfindlichkeit  
gegenüber *Actinobacillus pleuropneumoniae* beim Schwein**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Natalie Bertsch**

Tierärztin aus Groß-Umstadt

Gießen, 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Prof. Dr. Rolf Bauerfeind

Tag der Disputation: 04.10.2016

**Meiner Familie**

**Teile der Dissertation wurden veröffentlicht:**

Reiner G., Bertsch N., Hoeltig D., Selke M., Willems H., Gerlach G.F., Tuemmler B., Probst I., Herwig R., Drungowski M. & Waldmann K.H. (2014) Identification of QTL affecting resistance/susceptibility to acute *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *Mammalian Genome* 25 (3-4), 180-91.

Reiner G., Dreher F., Drungowski M., Hoeltig D., Bertsch N., Selke M., Wilems H., Gerlach G.F., Tuemmler B., Waldmann K.H. & Herwig R. (2014) Pathway deregulation and expression QTLs in response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *Mammalian Genome* 25, 600-17.

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung .....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 <i>Actinobacillus</i> spp. ....	3
2.1.1 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	3
2.1.2 Klinik und Pathologie.....	14
2.1.3 Immunologie und Abwehr.....	15
2.1.4 Bekämpfung .....	16
2.2 Krankheitsresistenz.....	18
2.2.1 Natürliche Krankheitsresistenzen bei Nutztieren .....	20
2.2.2 Natürliche Krankheitsresistenzen beim Schwein .....	21
2.3 Quantitative Trait Loci (QTL).....	29
2.3.1 Hintergrund.....	29
2.3.2 Durchführung der QTL-Analyse .....	31
2.3.3 Tiermodell und Familiendesigns .....	31
2.3.4 Aufzucht, Infektion und Phänotypbestimmung.....	34
2.3.5 Genmarker .....	34
2.3.6 Genetische Karte.....	38
2.3.7 QTL-Kartierung.....	40
2.4 QTL-Studien bei landwirtschaftlichen Nutztieren .....	42
2.4.1 QTL-Studien beim Schwein .....	43
2.4.2 QTL-Studien für Krankheitsresistenz.....	43
3 Material und Methoden .....	47
3.1 Versuchstiere .....	48
3.1.1 Informative Tierfamilie .....	48
3.1.2 Infektion der F <sub>2</sub> -Tiere .....	49
3.2 Phänotyp-Datenerhebung und Probengewinnung .....	49
3.2.1 Klinische Untersuchung .....	50
3.2.2 Pathologische Untersuchung .....	50

---

3.2.3	Respiratory Health Score.....	50
3.2.4	Mikrobiologische Untersuchung .....	51
3.3	Material für die eigenen Untersuchungen .....	51
3.3.1	Geräte und Labormaterialien .....	51
3.3.2	Chemikalien.....	52
3.3.3	Lösungen und Puffer .....	52
3.3.4	Computerprogramme und Datenbanken.....	53
3.4	Methoden für die eigenen Untersuchungen.....	54
3.4.1	DNA-Extraktion .....	54
3.4.2	Mikrosatellitenmarker .....	55
3.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	56
3.4.4	Fragmentlängenanalyse .....	59
3.4.5	Statistische Auswertung .....	63
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Phänotyp .....	65
4.2	Genotypen.....	65
4.2.1	Mikrosatellitenanalyse.....	65
4.2.2	Kopplungskarte der informativen Marker .....	70
4.3	QTL-Kartierung.....	70
4.3.1	Übersicht.....	70
4.3.2	QTL für den Klinischen Score .....	74
4.3.3	QTL für Respiratory Health Score .....	74
4.3.4	QTL für bildgebende Verfahren .....	74
4.3.5	QTL für Todesfälle, Sektions- und Re-Isolations-Score.....	75
4.3.6	QTL für RHS* .....	75
4.4	Phänotypen-Assoziations-Analyse .....	75
5	Diskussion .....	77
5.1	PCR und Gelelektrophorese .....	77
5.2	Marker .....	78
5.3	Gewählte Methode: QTL-Analyse .....	79
5.4	QTL-Ergebnisse .....	80
5.4.1	Einzelbetrachtung der ermittelten QTL.....	82
5.4.2	Zwischenfazit zur QTL-Analyse .....	92
5.4.3	Kombination positioneller und funktioneller Studien .....	93

---

5.5	Marker-Phänotyp-Assoziationen .....	94
5.6	Fazit .....	94
6	Zusammenfassung .....	96
7	Summary.....	98
8	Literaturverzeichnis .....	100
9	Anhang .....	141
	Danksagung .....	167
	Erklärung .....	168

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: F <sub>2</sub> -Familiendesign .....	32
Abbildung 2: Übersicht des Versuchsablaufes.....	47
Abbildung 3: Fragmentlängenanalyse.....	63
Abbildung 4: Positionen aller informativen Mikrosatellitenmarker und kartierte QTL auf SSC 1 bis SSC 9.....	72
Abbildung 5: Positionen aller informativen Mikrosatellitenmarker und kartierte QTL auf SSC 10 bis SSC 18.....	73
Abbildung 6: QTL auf SSC 2.....	74
Abbildung 7: Kombinatorische Effekte der Marker Swr345 und S0143 .....	76

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> Serotypen und deren Biovarzuordnung.....	5
Tabelle 2: Virulenzfaktoren von <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . .....	7
Tabelle 3: Apx-Toxine von <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (Bossé et al., 2002). .....	11
Tabelle 4: Erstellung der Tierfamilie.....	48
Tabelle 5: PCR Reaktionsansatz für Singleplex- und Multiplex-Ansätze. ....	57
Tabelle 6: Bedingungen Singleplex-PCR.....	57
Tabelle 7: Bedingungen für die Touchdown-PCR .....	58
Tabelle 8: Pipettierschema für den PCR-Ansatz (Multiplex-PCR) zur Längenstandardherstellung. ....	60
Tabelle 9: PCR-Bedingung zur Längenstandardherstellung. ....	60
Tabelle 10: Gelelektrophoresebedingungen. ....	62
Tabelle 11: Etablierte Mikrosatellitenmarker für die QTL-Berechnungen. ....	66
Tabelle 12: Statistische Ergebnisse der QTL-Analyse. ....	71
Tabelle 13: Liste aller im Rahmen dieser Studie getesteten Mikrosatelliten-Marker.....	140
Tabelle 14: Liste der etablierten Multiplex-PCRs. ....	161

**Abkürzungsverzeichnis**

Anova	Analysis of variance
<i>App</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BALF	Bronchoalveolarflüssigkeit
BC	Back-Cross
BHZP	Bundeshybridzuchtprogramm
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
cM	Centimorgan
DD	Daughter Design
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F <sub>0</sub>	Elterngeneration
F <sub>1</sub>	1. Filialgeneration
F <sub>2</sub>	2. Filialgeneration
GDD	Granddaughter Design
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRAS	Entwicklung von genetischen Markern zur Infektabwehr und Resistenz im Atemtrakt des Schweins
LOD	Logarithm of odds
LPS	Lipopolysaccharid
Mb	Megabasenpaare
mA	Milliampere
MAS	Marker Assisted Selection
min	Minute
Mio.	Millionen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Mrd.	Milliarden

---

µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mM	Millimolar
MS	Mikrosatellit
n	natürliche Zahl
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OMP	Outer Membrane Proteins
P.	Propionobacterium
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase Chain Reaction
p.i.	post infectionem
PIGMAP	Pig Major Acute Phase Protein
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PRDC	Porcine Respiratory Disease Complex
QTL	Quantitative Trait Locus
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RHS	Respiratory Health Score
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
sec	Sekunde
SLA	Swine Leukocyte Antigen
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	<i>Sus scrofa</i> chromosome
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STR	Short Tandem Repeats
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
USDA	United States Department of Agriculture
V	Volt
VNTR	variable number of tandem repeats
W	Watt
www	world wide web
>	größer als, mehr als
≤	kleiner gleich
%	Prozent

## 1 Einleitung

Erkrankungen der Lunge sind ein ernsthaftes Problem der modernen Schweineproduktion. Schätzungsweise 50 % aller antibiotischen Behandlungen gehen auf das Konto von Lungenerkrankungen. Das häufige Auftreten von Mischinfektionen aus viralen und bakteriellen Erregern wie *Porzines Reproductive und Respiratorisches Syndrom (PRRS)* -, *Circo-* und *Influenzaviren*, *Streptokokken*, *Mykoplasmen*, *Haemophilus*, *Pasteurellen*, *Bordetellen* und *Actinobacillus* wird unter dem Begriff „porcine respiratory disease complex“ (PRDC) zusammengefasst. Daneben sind die beteiligten Erreger aber auch einzeln und unabhängig voneinander in der Lage, schwerwiegende Krankheitsverläufe auszulösen.

Die porzine Pleuropneumonie wird durch das Gram-negative Stäbchenbakterium *Actinobacillus pleuropneumoniae (App)* verursacht. Sie ist charakterisiert als fibrinöse bis hämorrhagisch-nekrotisierende Bronchopneumonie und fibrinöse Pleuritis. Die Erkrankung betrifft Schweine jeden Alters und löst bei betroffenen Tieren erhebliche Schmerzen, Leiden und Schäden aus. Weltweit gilt die porzine Pleuropneumonie als Verursacher schwerwiegender wirtschaftlicher Verluste. Zu den Einbußen durch reduzierte tägliche Zunahmen von bis zu 33,6 % und einer reduzierten Futterwertung von 25,5 % addieren sich Kosten für prophylaktische und therapeutische Maßnahmen. Nicht zuletzt nimmt die Erkrankung häufig einen fatalen Verlauf und es kommt zu Todesfällen unter den erkrankten Tieren. Insgesamt wird der wirtschaftliche Schaden allein für Europa auf zwei Milliarden Euro geschätzt.

Oftmals wird der Erreger von Carriern, Trägertieren ohne klinische Anzeichen, weiterverbreitet. Zudem stellen Stress, Tierverkehr und Zukäufe Risikofaktoren dar, die zur Verbreitung von *App* beitragen und sich gleichzeitig auch auf Morbidität und Mortalität der Erkrankung auswirken. Eine zeitgleiche oder vorherige Infektion mit anderen Erregern des PRDC kann die Symptome der Pleuropneumonie noch verschärfen.

Momentan werden verschiedene Strategien zur Eindämmung der porzinen Pleuropneumonie verfolgt. Diese beinhalten unter anderem Impfungen und den Einsatz von Antibiotika. Der Erfolg von Impfmaßnahmen ist durch einen geringen Serovar-übergreifenden Schutz erhältlicher Impfstoffe und fehlender Markervakzinen limitiert. Neuere Vakzinen versprechen zwar einen besseren und umfassenderen Schutz, doch eine Erkrankung wird auch durch sie

nicht sicher verhindert. Am Ende ist der Einsatz von Antibiotika zur Kontrolle der Pleuropneumonie oft unerlässlich. Doch das immer häufigere Auftreten von Antibiotikaresistenzen und die sinkende Akzeptanz der Verbraucher für Fleisch von behandelten Tieren zwingen zur Entwicklung neuer, von Antibiotika unabhängigen Bekämpfungsmaßnahmen. Ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung der Tiergesundheit liegt in der weiteren Erforschung und Nutzung natürlicher Krankheitsresistenzen. Entdeckte Genvarianten könnten züchterisch genutzt werden und mithelfen, das Verständnis der komplexen Erreger-Wirts-Interaktion zu vertiefen und neue Prophylaxemaßnahmen zu entwickeln.

Die QTL (Quantitative Trait Locus)-Analyse ist ein Weg, um relevante Gene und ursächliche Polymorphismen für wichtige Merkmale zu beleuchten. Frühere Studien zeigen, dass das Kartieren von QTL für Immunmerkmale möglich ist. Trotzdem sind Studien zur Krankheitsresistenz/-empfindlichkeit noch immer rar. Bislang wurden QTL bezüglich der Resistenz gegenüber *Sarcocystis miescheriana*, *Pseudorabies-Virus* und *PRRSV* kartiert. Bezüglich *App* wurden kürzlich QTL für die chronische Form der Pleuropneumonie beschrieben. Zusätzlich wurden QTL für die ventro-craniale chronische Pleuritis kartiert, in deren Entstehung *App* zumindest partiell involviert sein kann. Im Rahmen des vom BMBF geförderten Projekts Fugato-IRAS konnten Resistenzunterschiede verschiedener Populationen gegenüber *App* nachgewiesen werden. Diese Vorarbeit motivierte dazu, im Rahmen des Folgeverbundprojekts Fugato-RePoRI die genetischen Hintergründe für die unterschiedliche Resistenz/Empfänglichkeit zu untersuchen. Das Ziel der vorliegenden Studie war, anhand der in Fugato-IRAS als unterschiedlich empfänglich beschriebenen Populationen, Hinweise auf die dabei beteiligten chromosomalen Regionen im Rahmen einer QTL-Studie zu erarbeiten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *Actinobacillus* spp.

*Actinobacillus* spp. sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien aus der Familie der *Pasteurellaceae*. Sie sind Verursacher einer Reihe von Erkrankungen bei Mensch und Tier, die sich in ihrer Krankheitsausprägung jedoch deutlich voneinander unterscheiden. Ihr Habitat ist der obere Respirationstrakt sowie die Nasen- und Mundhöhle (Rycroft & Garside, 2000). Beim Menschen wird *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Verbindung mit periodontalen Erkrankungen beobachtet (Slots & Listgarten, 1988). *Actinobacillus lignieresii* verursacht eine schleichend verlaufende, granulomatöse Entzündung des Weichteilgewebes bei Rindern und Schafen - die Aktinobazillose (auch Holzszunge genannt). Im Gegensatz zu diesem chronischen Verlauf erleiden Fohlen nach Infektion mit *Actinobacillus equuli* oftmals akut verlaufende, lebensbedrohliche Septikämien. Auch *App* verursacht häufig eine akut bis perakut verlaufende Erkrankung. Diese Pleuropneumonie der Schweine breitet sich rapide aus und nimmt mitunter einen tödlichen Verlauf (Rycroft & Garside, 2000).

#### 2.1.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

##### 2.1.1.1 Erreger, Ätiologie und Epidemiologie

Bakteriell bedingte respiratorische Erkrankungen spielen in der Schweineproduktion eine große Rolle (Hoeltig et al., 2009; Holmgren et al., 1999). *App* ist der Erreger der porzinen Pleuropneumonie (Jacques, 2004). Sie zählt weltweit zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten der modernen Schweineindustrie (Selbitz, 2007; Wilms-Schulze Kump, 2010). Durch das Auftreten von Todesfällen, den Einsatz von Medikamenten, geringere Futtermittelverwertung und verminderte Tageszunahmen ist die Pleuropneumonie für hohe wirtschaftliche Schäden verantwortlich und wirkt sich zudem abträglich auf eine tierschutzkonforme Schweineproduktion aus (Holmgren et al., 1999; Noyes et al., 1990; Straw et al. 1989).

Ende der fünfziger Jahre haben Pattison et al. (1957) diesen Keim erstmals als Ursache für Lungenerkrankungen identifiziert (Rycroft & Garside, 2000), damals noch unter dem Namen

*Haemophilus parainfluenzae*. Sieben Jahre nach Pattison gelang Shope eine umfassende Beschreibung von Erreger und hervorgerufenem Krankheitsbild (Shope, 1964; Shope et al., 1964; Rycroft & Garside, 2000). Bis zur endgültigen molekularbiologischen Einordnung zur Gattung *Actinobacillus* durch Pohl und Kollegen (Pohl et al., 1983) war *App* auch noch bekannt als *Haemophilus parahaemolytica*, *Haemophilus pleuropneumoniae* oder wurde als *Pasteurella haemolytica-like* bezeichnet (Inzana, 1991; Rycroft & Garside, 2000; Teich, 2003).

Die Klassifikation innerhalb von *App* erfolgt sowohl in Bio- als auch in Serovare. Ausschlaggebend für die Einteilung in Biovare sind die *in vitro*-Wachstumseigenschaften. Es wird zwischen einem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)-abhängigen (Biovar 1) und einem NAD-unabhängigen Biovar (Biovar 2) unterschieden (Tabelle 1) (Inzana, 1991; Jacques, 2004). Die Biovarzugehörigkeit steht in Bezug zur Virulenz, denn Erreger des Biovar 1 scheinen bei Erkrankungen eine größere Rolle zu spielen (Rycroft & Garside, 2000).

Anhand ihrer Kapsel (K)-Antigene werden *App*-Isolate in 15 verschiedene Serotypen eingeteilt. Innerhalb des Biovar I sind 13 Serotypen (1-12, 15) beschrieben, und für Biovar II zwei Serotypen (Serotyp 13, 14). Einige Stämme von Serotyp 2, 4, 7 und 9 können allerdings auch dem Biovar II zugeordnet werden (Tabelle 1) (Blackall, 2002; Dubreuil et al., 2000; Jacques, 2004; Fodor, 1989). Es gibt Vorschläge für eine exaktere Einteilung, indem man nicht nur das Kapselantigen sondern auch das Lipopolysaccharid (LPS)-Antigen berücksichtigt (Perry et al., 1990). Dies hat sich so jedoch nicht durchgesetzt. Die Ähnlichkeit und Gemeinsamkeit der LPS-Antigene der Serotypen 1/9/11, 3/6 und 4/7/8 (Haesebrouck et al., 1997) aber erklärt die starke Kreuzreaktivität bei gängigen Nachweismethoden, was eine erfolgreiche epidemiologische Überwachung erheblich erschwert (Dubreuil et al., 2000).

Die Prävalenz der einzelnen Serotypen ist von Land zu Land verschieden. Die Serotypen 1, 5 und 7 sind die häufigsten Serotypen in Nordamerika, während Serotyp 2 in Europa dominiert. In Deutschland herrschen hauptsächlich die Serovare 9, 2 und 7 vor (Dubreuil et al., 2000).

**Tabelle 1:** *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypen und deren Biovarzuordnung (Blackall et al., 2002 und Frey et al., 1995). Serotypen in Klammern sind nicht alleinig Biovar 2 zuzuordnen (siehe Text).

Biovar	Serotyp
1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15
2	(2), (4), (7), (9), 13, 14

Grundsätzlich sind alle Serotypen in der Lage schwerwiegende Krankheitsverläufe auszulösen, doch die Virulenz erscheint variabel (Frey, 1995; Haesebrouck et al., 1997). Es wird berichtet, dass die Serotypen 1, 5, 9 und 11 in Zusammenhang mit besonders schweren Verläufen mit hoher Mortalität stehen (Dubreuil et al., 2000). Die Serotypen 2-4, 6-8, 12 und 15 werden im Allgemeinen als weniger virulent eingestuft. Wobei Serotyp 3 eine geringe epidemiologische Bedeutung zugesprochen wird und die Isolation der Serotypen 10, 13 und 14 nur selten im Zusammenhang mit Krankheitsgeschehen gelingt (Frey, 2003). Der Grad der Virulenz wird hauptsächlich von der Ausstattung und Kombination der Exotoxine bestimmt (Bossé et al., 2002; Jacques, 2004; Haesebrouck et al., 1997). Die höchst virulenten Serotypen (1, 5, 9 und 11) produzieren die *App*-Exotoxine 1 und 2 (Frey, 1995).

Allerdings unterscheidet sich der Virulenzgrad nicht nur zwischen unterschiedlichen Serotypen, sondern von Land zu Land auch innerhalb der Serotypen. So lässt sich über die Virulenz eines Serotyps keine Aussage machen, solange die Herkunft unbekannt ist. Beispielsweise gehört Serotyp 2 in Nordamerika zu den gering virulenten und Serotyp 7 meist zu den höchst virulenten Serovaren, während in Europa fast alle Serotyp 2-Stämme hoch virulent sind und Serotyp 7 nur eine mittlere Virulenz aufweist (Gottschalk, 2007; Klitgaard et al., 2010).

Serotypen von mittlerer oder geringer Virulenz können aber auch indirekt erheblichen Schaden anrichten. Studien am Modellorganismus Maus zu Interaktionen zwischen Serotypen lassen vermuten, dass durch eine Infektion mit schwächer virulenten Serotypen, betroffene Tiere noch anfälliger werden für hochvirulente Serotypen (Komal & Mittal, 1990).

Innerhalb einer Herde überwiegt meist ein Serotyp, es werden aber auch mehrere Serotypen auf einem Betrieb nachgewiesen (Chiers et al., 2010).

### 2.1.1.2 Infektion, Virulenzfaktoren und Pathogenese

Die Erkrankung durch *App* ist ein multifaktorielles Geschehen. Neben den zahlreichen Virulenzfaktoren des Erregers spielen auch diverse Umweltfaktoren eine herausragende Rolle. So können Nachbarherden einen messbaren Infektionsdruck aufbauen, der zusätzlich durch ein verbesserungswürdiges Management im Betrieb selbst forciert wird (Stärk, 2000). Allgemeine Hygienemaßnahmen (Reinigung, Desinfektion, „Rein-Raus-Verfahren“) und Zukäufe aus mehr als 2 Herkunftsbetrieben (Maes et al., 2001) beeinflussen ebenso die Lungengesundheit wie Besatzdichte, Luftfeuchte, Temperatur oder Ventilation. Durch suboptimales Management wird einerseits direkt die Erregerdichte erhöht und andererseits werden die Tiere diversen Stressoren ausgesetzt, was in einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit resultiert (Stärk, 2000). Für die Übertragung von Tier zu Tier bedarf es grundsätzlich dreier Anforderungen: (1) Exkretion durch infizierte Tiere, (2) kritische Erregerdichte, (3) Kontakt empfänglicher Tiere zum Erreger (Stärk, 2000).

*App* ist strikt wirtsspezifisch. Sein Habitat ist der Respirationstrakt des Schweins. Er lässt sich in Pharynx, Tonsillen, Lunge und in der Nasenschleimhaut infizierter Tiere nachweisen. Allerdings gelang auch ein initialer Nachweis des Erregers im Zusammenhang mit Arthritis beim Lamm (Olander, 1963; Dubreuil et al., 2000) sowie Osteomyelitis und Otitis media beim Schwein, wobei er sich im Falle der Osteomyelitis sogar als invasiv erwies (Duff et al., 1993; Jensen et al., 1999). Naive Tiere infizieren sich durch direkten Kontakt (auch von Muttersauen auf ihre Ferkel) oder via Tröpfcheninfektion über kurze Distanzen. Die Pleuropneumonie befällt Tiere jeden Alters, tritt aber am häufigsten bei Tieren in der Mastperiode auf. Tiere im Alter von 12 Wochen scheinen am anfälligsten (Chiers et al., 2010; Cruijisen et al., 1995a). In einem endemischen Betrieb lässt sich der Erreger häufig schon in Tonsillen von 4 Wochen alten Ferkeln nachweisen. Der Erregernachweis aus Lungengewebe und das Auffinden von Schäden an der Lunge gelingt aber meist erst später (Chiers et al., 2002). Von der Lunge breiten sich die Erreger via Lymphbahnen auf die Pleura aus. Bakteriämien sind selten (Ajito et al., 1996; Bossé et al., 2002). Nach überstandener Erkrankung entwickeln die Tiere eine Serotyp-spezifische Immunität (Cruijisen et al., 1995b), bleiben aber weiterhin Ausscheider.

Die Pathogenese der Pleuropneumonie ist komplex. Für *App* sind eine Reihe von Virulenzfaktoren beschrieben, darunter: Kapsel, LPS, diverse Oberflächenproteine (*Outer Membrane Proteins*; OMPs), Transferrin-bindende Proteine, Biofilme, Proteasen, Exotoxine

und Adhäsine (Haesebrouck et al., 1997). Ausgestattet mit diesem Sortiment an Virulenzfaktoren gelingt *App* (1) die Adhäsion und Kolonisation im oberen und unteren Respirationstrakt, (2) die Beschaffung benötigter Nährstoffe, (3) die Schädigung des Wirtsgewebes und (4) das Umgehen der *Clearence*-Mechanismen des Wirts (Bossé et al., 2002; Chiers et al., 2010). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Virulenzfaktoren von *App* und deren Bedeutung für die Pathogenese.

#### (1) Virulenzfaktoren involviert in Adhäsion und Kolonisation

Bevor der Erreger sich vermehren kann, muss er eine adhäsive Verbindung mit dem Epithel des Wirts eingehen. *In vivo*-Studien zeigen, dass *App* sich bevorzugt an Epithelien im unteren Respirationstrakt bindet. Im Gegensatz dazu geht er nur beschwerlich Verbindungen zu Zellen im oberen Respirationstrakt ein (Bossé et al., 2002; Dom et al., 1994).

**Tabelle 2:** Virulenzfaktoren von *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Virulenzfaktor	Wirkung
Kapsel	maskiert Adhäsine vor Immunsystem, Persistenz in Makrophagen, Schutz gegen Komplement-Killing
LPS	Adhäsion im oberen und unteren Respirationstrakt, Bindung von porzinen Häm-Produkten, Persistenz in Makrophagen, Nekrose, Interaktion mit Immunsystem, erhöht Toxizität von Apx I und II
OMP	Adhäsion im unteren Respirationstrakt, Bindung von porzinem Häm-Produkten
Transferrin-bindende Proteine und Siderophor-Rezeptoren	Eisenerwerb
Biofilm	Adhäsion, Schutz vor Angriffen des Immunsystems
Proteasen	Zelluntergang (Gelatine, Hämoglobin, Immunglobuline)
Exotoxine	Hämolyse, Zytolyse
Fimbrien	Adhäsion im oberen und unteren Respirationstrakt
anaerobe Energiegewinnung	Persistenz
Urease	Persistenz, Hemmung der B-Zellen
Transport-Operon für Nickel- und Kobaltaufnahme	Erwerb von Nickel und Kobalt
Maltoseregulon	Aufnahme von Maltose, Beteiligung an Oberflächenpolysaccharidstruktur
Superoxiddismutase	Persistenz in Makrophagen
Heat-shock-Protein	Persistenz in Makrophagen

### oberer Respirationstrakt

Der Kolonisation des oberen Respirationstraktes und der Tonsillen wird eine grundlegende Bedeutung für die Persistenz von *App* (Chiers et al., 2010) beigemessen. Tatsächlich findet man in manch subklinischen Fällen auch eine ausschließliche Besiedlung der Tonsillen, ganz ohne Lungenbeteiligung. Solche Tiere sind völlig symptomfreie Trägertiere, in denen sich auch keine Antikörper nachweisen lassen (Chiers et al., 2010). Bei der Adhäsion an Tonsillen und Nasenschleimhaut scheinen vor allem die Fimbrien eine entscheidende Rolle zu spielen (Bossé et al., 2002). Sie wurden bislang für Serotyp 1, 2, 7 und 12 nachgewiesen (Bossé et al., 2002; Zhang et al., 2000). Zusätzlich weiß man, dass das LPS des Erregers an der Bindung an Trachealmukus und -zellen beteiligt ist (Bélanger et al., 1994; Paradis et al., 1994). Für die initiale Adhäsion an Tonsillen wird ein ähnlicher Mechanismus vermutet. Für eine festere Anheftung wird in einem zweiten Schritt eine spezifische Bindung propagiert (Chiers et al., 1999; Chiers et al., 2010). Ob wie bei der Tonsillitis des Menschen bekannt, auch die Biofilmformation zur Adhäsion an den Tonsillen beiträgt, muss noch geklärt werden (Al-Mazrou & Al-Khattaf, 2008).

Es ist unwahrscheinlich, dass einer Lungeninfektion immer die Besiedlung der oberen Atemwege vorweggehen muss. Bei einer Tröpfcheninfektion (bspw. Niesen) sind die Partikel jedenfalls klein genug, um direkt in die unteren Atemwege zu gelangen (Bossé et al., 2002; Utrera & Pijoan, 1991).

### unterer Respirationstrakt

Zahlreichen Virulenzfaktoren wird ein Beitrag an der Adhäsion im unteren Respirationstrakt zugesprochen (Chiers et al., 2010). Die Expression von Fimbrien wird von den vorliegenden Wachstumsbedingungen reguliert. Beispielsweise produziert *App* seine Typ 4-Fimbrien erst bei Kontakt mit Lungenepithelzellen (Boekema et al., 2004), was eine mögliche Beteiligung an der Adhäsion nahelegt. Auch LPS sind an der Adhäsion beteiligt (Jacques et al., 2005). Im porzinen respiratorischen Epithel konnten mögliche Rezeptoren für LPS nachgewiesen werden (Bélanger et al., 1994; Abul-Milh et al., 1999). Eine neuere Studie belegt den eindeutigen Zusammenhang zwischen Adhäsion und LPS. In dieser Studie mit mutanten Stämmen ließ sich zeigen, dass mit veränderter LPS-Struktur die Fähigkeit zur Adhäsion verloren geht (Ramjeet et al., 2005). Diese Forschungsarbeit macht im Speziellen eine intakte Core-Region des LPS für die Bindung verantwortlich.

*App* besitzt verschiedene OMP. Für viele dieser Proteine wird eine Bedeutung für die Adhäsion im Wirt gesehen. Beispielsweise ist bei Bakterien der Serotypen 5a, 9 und 10 eine

optimale Anheftung an das Wirtsepithel mit der Expression eines bislang einzigartigen OMP assoziiert (van Overbeke et al., 2002). Obwohl der genaue Mechanismus hier noch unklar ist, wird ihm eine Bedeutung bei der Adhäsion zugeteilt (van Overbeke et al., 2002). Ein anderes OMP wird in Zusammenhang mit der Bindung an Kollagen und Fibrinogen in der Schweinelunge gebracht. Für diese Adhäsion wurde eine Calcium-Abhängigkeit beobachtet (Enriquez-Verdugo et al., 2004). Außerdem wurde ein weiteres OMP mit Ähnlichkeit zu einem Adhäsion entdeckt, welches entscheidend für die Anheftung von *Yersinia* ist (Chung et al., 2007; Chiers et al., 2010).

Die Kapsel leistet wohl keinen direkten Beitrag zur Bindung. Eventuell maskiert sie aber zumindest teilweise vorhandene Adhäsine an der Oberfläche (Chiers et al., 2010; Rioux et al., 2000; van Overbeke et al., 2002). Man vermutet, dass auch der Biofilm eine Rolle bei der Adhäsion spielt. Beispielsweise werden die Gene für die Biofilmproduktion bei Kontakt mit Lungenepithel hochreguliert (Auger et al., 2009). Es mag aber auch sein, dass der Biofilm einfach durch das Immunsystem beschädigte Bereiche verdeckt und vor den Angriffen antimikrobieller Substanzen schützt, und so indirekt zur Kolonisation und Persistenz beiträgt (Bossé et al., 2010). Die genaue Bedeutung muss, genauso wie der Befund, dass homologe Gene bei anderen Bakterien zur Adhäsion beitragen sowie die vermutete Kapazität zur Bindung an Surfactant, genauer erarbeitet werden (Chiers et al., 2010).

*App* ist in der Lage auf Epithelien, aber auch in Tonsillen oder gar nekrotischem Lungengewebe zu überleben. Für diese Persistenz ist es entscheidend, sich an die Umgebungsbedingungen anpassen zu können. Auf diese sauerstoffarmen Bedingungen reagiert der Erreger mit der Umstellung auf eine anaerobe Energiegewinnung (Chiers et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass *App* die Genexpression für Enzyme der anaeroben Energiegewinnung hochreguliert (Jacobsen et al., 2005; Lone et al., 2009a). Welchen Einfluss diese Enzyme auf die Virulenz des Erregers haben, zeigen Studien von Baltes et al. (2003a; 2005) und Jacobsen et al. (2005). Sie konnten aufzeigen, dass das Fehlen von Enzymen für die anaerobe Energiegewinnung mit einer Abschwächung von Kolonisation, Persistenz und akutem Krankheitsgeschehen einhergeht.

## (2) Virulenzfaktoren für den Erwerb von Nährstoffen

Nach der Anheftung an die Wirtszellen ist die Beschaffung benötigter Nährstoffe für Wachstum und Vermehrung essentiell für die Etablierung einer Infektion. Im Respirationstrakt sind nur begrenzt Nährstoffe vorhanden. Die Fähigkeit zum Erwerb dieser ist somit grundlegend für die Virulenz von *App*.

Eisen ist essentiell für das Überleben und den Metabolismus des Bakteriums. *App* bindet porzines Transferrin, verwertet Eisen aus Häm-Komponenten (freies Häm, Hämin, Hämatin, Hämoglobin) und bildet Siderophor-Rezeptoren aus (Chiers et al., 2010). Es hat sich gezeigt, dass die Fähigkeit Transferrin-gebundenes Eisen zu verwerten entscheidend ist für die Virulenz (Baltes et al., 2002). Es werden zwei unterschiedliche Transferrin-bindende Proteine (transferrin-binding protein A und B) produziert (Haesebrouck et al., 1997), letzteres ist zusätzlich auch in der Lage Haemin zu binden (Gerlach et al., 1992). Ihre Expression ist gekoppelt an die Transkription eines Transportproteinkomplexes, der für die Bereitstellung der Energie für den Membrantransport zuständig ist (Moeck & Coulton, 1998). Studien von Baltes et al. (2001) und Fuller et al. (2000) konnten einen Zusammenhang zwischen der Ausbildung des Transportproteins für Transferrin-gebundenes Eisen und Virulenz aufzeigen. Auch Klitgaard et al. (2010) konnten berichten, dass die unterschiedliche Virulenz der Serotypen und Stämme in direktem Bezug zu ihrer Fähigkeit zum Eisenerwerb steht. So konnten sie zeigen, dass Serotypen von hoher und niedriger Virulenz auf Eisenentzug generell mit fast identischer Genregulation reagieren. Nämlich mit Hochregulation von Genen für den Eisenerwerb und Runterregulation von Genen, die in Eisenverbrauch involviert sind. Allen voran Gene für die anaerobe Energiegewinnung. Eine zwischen den Serotypen unterschiedliche Genregulation konnten sie für die Gene, die für die Häm-/Haptoglobin bindenden Proteine kodieren nachweisen. Ein als weniger virulent eingestuft Serotyp 3 zeigt im Vergleich unter Eisenrestriktion eine signifikant niedrigere Hochregulation.

Mittels Hämolyse zerstört *App* rote Blutkörperchen (Bossé et al., 2002) und gelangt so an Häm-Produkte, die von LPS (Bélanger et al., 1995) und OMP gebunden werden (Shakarji et al., 2006). Eine Studie von Negrete-Abascal et al. (1994) zeigt die *in vitro*-Aktivität einer zusätzlichen Protease, welche Hämoglobin zersetzt. Von anderen Bakterien ist bekannt, dass das so freigesetzte Häm daraufhin von Häm-/Hämoglobintransportern in die Zelle verbracht wird (Genco & White Dixon, 2001). Die Annahme, dass dies bei *App* einen ähnlichen Verlauf haben könnte, wird durch die Studie von Klitgaard et al. (2010) bestärkt.

Eisen ist nicht die einzig limitierte Ressource im porzinen Respirationstrakt. Auch Nickel ist nur in äußerst geringen Konzentrationen verfügbar, gleichzeitig als Co-Faktor aber essentiell für die Urease-Aktivität (Bossé et al., 2002). Die Virulenz von *App* während der Infektion wiederum hängt entscheidend von der Ureaseproduktion ab. Einerseits scheint sie B-Zellen zu hemmen (Baltes et al., 2001) und andererseits zur Persistenz in Makrophagen beizutragen

(Klitgaard et al., 2012). Ein vermeintliches Transport-Operon für Nickel- und Kobaltaufnahme ist beschrieben (Bossé et al., 2001; Chiers et al., 2010), der genaue Mechanismus für den Erwerb sowohl von Nickel als auch von Kobalt ist aber noch nicht vollständig erforscht (Chiers et al., 2010).

Die Aufnahme von Maltose erfolgt über ein OMP (Deneer & Potter, 1989). Nachweislich werden die Gene für die Maltose-Regulation bei Kontakt zur Bronchoalveolarflüssigkeit hochreguliert (Lone et al., 2009a). Zusätzlich zum Maltosetransport und -metabolismus sind die Gene des Maltoseregulons auf bislang ungeklärte Weise auch mit der Virulenz des Erregers verknüpft. Man vermutet eine Beteiligung an der Oberflächenpolysaccharidstruktur (Lone et al., 2009b).

### (3) Virulenzfaktoren involviert in die Schädigung von Geweben

Hauptverursacher der von *App* verursachten Gewebeschädigung sind Apx-Exotoxine (Frey, 1995). Diese Apx-Toxine gehören zur Gruppe der „pore-forming-Rtx-Toxine“ (Repeats-in-Toxin). *App* produziert die Toxine Apx I, II, III und IV (Tabelle 3). Diese vier Exotoxine wirken direkt cytolytisch und/oder hämolytisch und indirekt über die Stimulation der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und proteolytischen Enzymen aus Phagozyten (Bossé et al., 2002; Frey, 1995; Haesebrouck et al., 1997; Schaller et al., 1999). Die virulentesten Serotypen (1, 5, 9 und 11) produzieren eine Kombination der Toxine Apx I und II (Frey, 1995).

**Tabelle 3:** Apx-Toxine von *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Bossé et al., 2002).

Toxin	hämolytisch	cytolytisch	Serotyp
Apx I	stark	stark	1, 5a, 5b, 9, 10, 11
Apx II	schwach	moderat	alle außer 10
ApxIII	keine	stark	2, 3, 4, 6, 8
ApxIV*	schwach	**	alle

\* ApxIV wird nur *in vivo* produziert

\*\* noch nicht bestimmt

Apx-Toxine verursachen die Lysis von Epithelzellen, Blutzellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Frey et al., 1993). Zusätzlich provoziert *App* einen „oxidative burst“ in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Es kommt zu einer exzessiven Produktion von

Sauerstoffradikalen. Vom Körper als Abwehrreaktion gegen das Pathogen gedacht, wirkt sich diese massive Anflutung von Sauerstoffradikalen jedoch auch schädlich auf umliegendes körpereigenes Gewebe aus (Dom et al., 1992; Haesebrouck et al., 1997).

Selbst in Anwesenheit neutralisierender Antikörper gegen ihr Toxin ist es *App* möglich Wirtsgewebe zu schädigen. Der Grund hierfür wird in der engen Adhäsion gesehen. Dies ermöglicht es *App* Toxine in hohen Konzentrationen direkt auf die Oberfläche der Epithelzellen zu entlassen, und so den Antikörpern zu entgehen (Haesebrouck et al., 1997). Diese herausragende Bedeutung der Apx-Toxine für die Virulenz verdeutlicht zudem die Tatsache, dass experimentell veränderte Stämme, ihrer Fähigkeit zur Apx-Produktion beraubt, in ihrer Virulenz eingeschränkt sind (Park et al., 2009).

Alle Serotypen produzieren Apx IV. Dies Toxin wurde erst 1999 von Schaller et al. (1999) entdeckt. Es wird ausschließlich unter *in vivo*-Bedingungen und experimentell erst nach Kontakt zu BALF (Bronchoalveolarflüssigkeit) produziert (Lone et al., 2009 a, b). Baltes & Gerlach (2009) gelang zudem der Nachweis der Transkription von Apx IV in nekrotischem Lungengewebe nach *App*-Infektion. Die Klärung der genauen Funktion und Rolle in der Pathogenese erfordert weitere Forschung, doch die Expression von Apx IV scheint mit ausschlaggebend für die Virulenz des Erregers zu sein (Chiers et al., 2010; Liu et al., 2009).

Die Effektivität der Exotoxine geht Hand in Hand mit den LPS von *App*. LPS sind der Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Zellen. Vermeintlich wird durch direkte Interaktion und Bindung von LPS an Apx I und II deren Toxizität erhöht (Fenwick & Henry, 1994; Ramjeet et al., 2008).

Auch LPS bewirken einen Zelluntergang. Einerseits führt es direkt über Bindung an Toll-Like-Rezeptoren (TLR) zu einer Nekrose des Lungenepithels (Chiers et al., 2010; Auger et al., 2009; Nishikori, 2005), andererseits über Interaktion mit dem Immunsystem des Tieres zu einer massiven Infiltration von Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) (Bossé et al., 2002; Ramjeet et al., 2005).

Über die Aktivierung der Produktion von Cytokinen (Interleukin 1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 6 und 8) durch LPS kommt es zu einer weiteren Rekrutierung von PMNs. IL-8 gilt als effektiver Chemoattractant für neutrophile Granulozyten (Baarsch et al., 1995; Choi et al., 1999; Skovgaard et al., 2010). Der daraus resultierende Zelluntergang könnte mitverantwortlich für die Entstehung der typischen Läsionen der porzinen Pleuropneumonie sein (Ramjeet et al., 2005). Zusätzlich aktivieren die LPS auf alternativem Wege das Komplementsystem, was einerseits wiederum weitere neutrophile Granulozyten und Makrophagen aktiviert und andererseits über Aktivierung weiterer Mediatoren zu Thrombozytenaktivierung und einer Konstriktion der

Luftwege führt (Bossé et al., 2002). Die durch Apx-Toxine verursachten Schäden am Endothel und die direkte Aktivierung von Gerinnungsfaktor XII durch LPS führen zum Anlaufen der Gerinnungskaskade, zu Fibrinolyse und Aktivierung des Kininsystems. Die Initiierung der Gerinnungskaskade führt zu Mikrothromben, lokaler Ischämie und schließlich Nekrosen (Bossé et al., 2002).

Neben Exotoxinen und LPS tragen auch die schon erwähnten Proteasen zum Zelluntergang bei, indem sie Gelatine, Actin und Hämoglobin zersetzen (Chiers et al., 2010; Negrete-Abascal et al., 1994).

#### (4) Virulenzfaktoren zum Umgehen der Wirtsabwehr

Ausgestattet mit einer Vielzahl an Virulenzfaktoren, besitzt *App* mehrere Möglichkeiten sich den Angriffen des Immunsystems zu entziehen.

Bakterien, die nicht durch mukoziliäre *Clearance* abgewehrt wurden, werden von phagozytotischen Zellen angegriffen und eliminiert (Bossé et al., 2002). *App* setzt diese Gesetzmäßigkeit außer Kraft. Der Hauptmechanismus zur Umgehung der Wirtsabwehr sind die Exotoxine. Die von *App* sezernierten Exotoxine Apx I, II und III zerstören Neutrophile und Makrophagen (Chiers et al., 2010; Cullen & Rycroft, 1994; Dom et al., 1992a). Und selbst in sublytischer Dosis hindern sie die Chemotaxis und Phagozytose (Tarigan et al., 1994).

Kommt es zur Phagozytose durch neutrophile Granulozyten, kann *App* effektiv abgetötet werden, während das Bakterium in Makrophagen bis zu 90 min überleben kann. In diesem Zeitraum sezerniert es Exotoxine, die zur Lysis der Makrophagen führen (Crujisen et al., 1992). Mehrere Faktoren tragen zur Fähigkeit bei in diesem Milieu voller Sauerstoffradikale überleben zu können (Bossé et al., 2002; Chiers et al., 2010): Das komplexe Kohlenhydratgerüst von Kapsel und LPS als Schutz auf der Oberfläche (Bilinski, 1991), eine Superoxiddismutase zur Abwehr der Superoxid-Radikale (Langford et al., 1996), Bildung von *heat-shock*-Proteinen zum Schutz vor Proteinaggregation (Fuller et al., 2000) und als Produkt der Ureaseaktivität die Bildung von Ammoniumionen, welches die Phagosom-Lysosom-Fusion inhibieren und den intralysosomalen pH-Wert anheben (Bossé et al., 2000).

Zusätzlich zur Beeinflussung der phagozytotischen Zellen durch Exotoxine, wird auch das spezifische Abwehrsystem durch *App* in seiner Wirkung behindert. Zwar gibt es unterschiedliche Ergebnisse zur Bedeutung der Immunglobuline G bei der Abwehr von *App*, doch sezernierte Proteasen zerstören neben porciner Gelatine und Haemoglobin auch Immunglobuline A (IgA) und G (IgG) (Bossé et al., 1992; Crujisen et al., 1995b;

Haesebrouck, 1997). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen außerdem, dass Serotyp 5a ein Kapselpolysaccharid ausbildet, welches IgG weit entfernt von der äußeren Membran bindet (Ward & Inzana, 1994).

Das Komplementsystem kann einerseits die Phagozyten via Opsonierung unterstützen, andererseits aber auch direkte zytolytische Effekte auf das Bakterium ausüben (Bossé et al., 2002). Ward & Inzana (1994) konnten zeigen, dass *App* durch seine Kapsel weitgehend gegen Komplement-*killing* geschützt ist. Zwar wird nicht die Komplementaktivierung selbst verhindert, aber die Menge an Faktor C9, einem wichtigen Teil des Membranangriffskomplexes, wird erheblich reduziert.

Schließlich vermutet man, dass die Bildung von Biofilm polymorphkernige Neutrophile und Makrophagen von den Bakterien fernhält und sie so vor Angriffen schützt (Chiers et al., 2010; Donlan & Costerton, 2002).

### **2.1.2 Klinik und Pathologie**

Charakteristisch für die porcine Pleuropneumonie sind die hämorrhagisch nekrotisierende Pneumonie und die fibrinöse Pleuritis (Haesebrouck et al., 1997).

Abhängig von Serotyp, Immunstatus und Erregerdichte können vier Verlaufsformen unterschieden werden: Perakut, akut, chronisch und subklinisch (Hoeltig, 2008; Dubreuil et al., 2000).

Perakute und akute Verlaufsformen sind gekennzeichnet durch hohes Fieber, Anorexie, erhöhte Atemfrequenz, Husten, Dyspnoe und Cyanose. Austretender hämorrhagischer Schaum aus Nase und Maul sind Zeichen von Lungenödemen und Vorboten eines baldigen Verendens (Bossé et al., 2002; Dubreuil et al., 2000; Hoeltig, 2008).

Makroskopische und mikroskopische Veränderungen finden sich vor allem an den caudalen Lobi der Lungen. Man beobachtet hochgradige Ödeme, Entzündung mit Infiltration von Phagozyten (Makrophagen und neutrophile Graulozyten), Ausschüttung von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Hämorrhagien und Nekrosen (Cho & Chae, 2002; Dubreuil et al., 2000; Ramjeet et al., 2005).

In einem frühen Krankheitsstadium dominieren massive Infiltrationen mit neutrophilen Granulozyten, Ödeme und fibrinöse Exsudationen (Bossé et al., 2002). Später überwiegen Makrophagen und Nekrosen (Hennig-Pauka et al., 2012). Eine massive nekrotisierende Vaskulitis führt zur Schädigung der Blut-Lungen-Schranke und ist ursächlich für die beobachteten Hämorrhagien (Serebrin et al., 1991). Zusätzlich findet man regelmäßig serös-

blutige Flüssigkeitsansammlungen in der Thorakalhöhle, eine diffuse fibrinöse Pleuritis und Pericarditis (Dubreuil et al., 2000).

Tiere, welche die Krankheit überstehen, können sich erholen, es bleiben jedoch häufig nekrotische Sequester und Abszesse zurück (Bossé et al., 2002).

### 2.1.3 Immunologie und Abwehr

Der humoralen Abwehr wird eine Schlüsselfunktion im Kampf gegen *App* zugesprochen (Rycroft & Garside, 2000; Bossé et al., 1992).

Bossé und Kollegen (1992) konnten zeigen, dass die Übertragung von Immuneren einen Schutz vor Pleuropneumonie vermittelt und zu ähnlich hohen IgG-Werten wie in aktiv immunisierten Schweinen führt. Daraus folgerten sie, dass der Schutz hauptsächlich über IgG Antikörper vermittelt wird (Bossé et al., 1992). Ein passiver Schutz wird auch über kolostrale Antikörper vermittelt. Mit sinkendem Antikörperspiegel geht dieser Schutz allerdings wieder verloren (Dubreuil et al., 2000; Haesebrouck et al., 1997; Nielsen, 1995). Eine Kolonisation von Tonsillen und Nasenschleimhaut wird von maternalen Antikörper nicht verhindert (Chiers et al., 2002).

Desweiteren wird nach Infektion ein Anstieg von IgA verzeichnet (Bossé et al., 1992). Eine vermehrte Produktion und Sekretion von IgA durch die Mukosa ist ein bekanntes Phänomen. Aufgabe ist es die bakterielle Besiedlung der Schleimhaut zu verhindern (Rycroft & Garside, 2000). Schweine können nach überstandener Pleuropneumonie wiederholt an der Infektion mit *App* erkranken. Konvaleszente Tiere haben nur gegen homologe Stämme einen wirksamen Schutz (Crujisen et al., 1995b). Die Immunität gegen heterologe Stämme variiert, was auf eine gewisse Kreuz-Reaktivität hinweist (Crujisen et al., 1995b). In dieser Studie von Crujisen und Kollegen an *App* Serotyp 8 und 9 waren neutralisierende Antikörper gegen Apx-Toxine allerdings nicht essentiell für die entwickelte Immunität. Vielmehr vermuten Crujisen und Kollegen eine Beteiligung von Antikörpern gegen andere Virulenzfaktoren wie Kapsel, LPS und OMP.

Infektionen des oberen Respirationstrakts führen nicht zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegenüber Apx-Toxinen. Dies bedeutet auch, dass solche subklinisch infizierten Tiere von derartigen serologischen Assays nicht erfasst werden (Chiers et al., 1992).

Neuere Studien belegen die herausragende Rolle der angeborenen, unspezifischen Immunantwort. „Antimicrobial peptides“ sind eine wichtige Komponente des angeborenen

Immunsystems (Ramjeet et al., 2005). Sie werden von phagozytotischen Zellen oder auch Epithelzellen exprimiert. Auf Grund ihrer positiven Ladung haben sie eine hohe Affinität zum negativ geladenen LPS Gram-negativer Bakterien. Ihre Wirkung beruht hauptsächlich auf der Bildung von Poren in der Bakterienmembran (Ramjeet et al., 2005).

Im Jahre 2006 zeigte eine Proteomanalyse von Hennig-Pauka et al. an chronisch mit *App* infizierten Schweinen eine erhöhte Expression von „antimicrobial peptides“ (hier sogenannte Cathelicidine) und Calgranulin C in der BALF. Sechs Jahre später konnten sie zusätzlich zeigen, dass das Cathelicidin PR-39 nicht nur im Lungengewebe von erkrankten, sondern auch von gesunden Tieren nachweisbar ist. Sie leiten aus dieser Beobachtung die besondere Rolle dieses Peptids bei dem dynamischen Prozess der Erhaltung der Gesundheit unter Einwirkung von Mikroorganismen und Umweltfaktoren ab.

Als Teil der frühen Immunantwort sind die „Akutphasenproteine“ bedeutend. Während der Infektion mit *App* wird die Expression entsprechender Gene (Serum-Amyloid-A, C-reaktives Protein, Fibrinogen, Haptoglobin, Pig Major Acute Phase Protein (PIGMAP) und TNF) hochreguliert (Hedegaard et al., 2007; Skovgaard et al., 2010).

Benga et al. (2009) konnten die Haptoglobinkonzentration im Blut in Bezug zur klinischen Manifestation der Infektion setzen. Im Rahmen ihrer Studie wurden unterschiedliche Zuchtlinien nach standardisierter *App*-Infektion auf Expression von Immunmarkern und klinische Krankheitsanzeichen untersucht. Es stellte sich heraus, dass eine Steigerung der Plasmahaptoglobin-Konzentration mit der Schwere der Erkrankung einhergeht.

Zusätzlich lässt sich schon kurz nach einer *App*-Infektion eine erhöhte Expression der Interleukine (IL) 1, 6, 8 und eines LPS-binding-proteins nachweisen (Skovgaard et al., 2010). IL-1, 6 und TNF $\alpha$ , die am Ort der Infektion produziert werden, werden über die Blutbahn zur Leber transportiert und initiieren und kontrollieren die Expression der „Akutphasenproteine“ (Skovgaard et al., 2010). IL-8 gilt, wie bereits erwähnt als potenter chemo-attractant für neutrophile Granulozyten. Über die Rolle von Phagozyten, siehe Abschnitt „Virulenzfaktoren und Pathogenese“ (2.1.1.2).

#### **2.1.4 Bekämpfung**

Zurzeit werden mehrere Wege zur Bekämpfung der porzinen Pleuropneumonie verfolgt. Das Repertoire erstreckt sich von Maßnahmen des Haltungsmanagements über Impfung bis zur Verabreichung von Antibiotika (Cleveland-Nielsen et al., 2002).

Impfung wird bislang als beste Herangehensweise zur Bekämpfung der porzinen Pleuropneumonie (Bossé et al., 2002; O'Neill et al., 2010) angesehen. Die Effizienz von Impfprogrammen wird allerdings oftmals durch fehlenden Serovar-übergreifenden Schutz und fehlende Markervakzinen verhindert (Higgins et al., 1985; Fenwick & Henry, 1995).

Impfstoffe der ersten Generation (meist bestehend aus Ganzzellbakterien) können zwar eine Reduktion der Mortalitätsrate bewirken, aber weder die Entstehung von Lungenläsionen noch die Besiedlung der Atemwege sicher verhindern. Zusätzlich wirken sie nur Serovar-spezifisch und es ist keine Unterscheidung zwischen geimpften und erkrankten Tieren möglich (Buettner et al., 2011).

Neue Subunit-Vakzinen versprechen einen besseren Serovar-übergreifenden Schutz (Haesebrouck et al., 1997). Mehrere Studien belegen die Vorteile einer kommerziell erhältlichen Subunit-Vakzine, welche auf Apx-Toxinen und einem OMP basiert (Shao et al., 2010; Tumamao et al., 2004). Und trotzdem bieten auch sie keinen kompletten Schutz vor Erkrankung (O'Neil et al., 2010).

Am Modellorganismus Maus wurde eine Studie zur Rolle von *Propionibacterium (P.) acnes* bei der Immunität gegen *App* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die humorale Antwort auf *P. acnes* gleichzeitig auch gegen *App* Serotyp 1 und 5 schützt. Man verspricht sich von dieser Erkenntnis eine Hilfe bei Entwicklung geeigneter heterologer Impfstoffe gegen *App* (Li et al., 2013; Yang et al., 2014). Eine andere Studie beschäftigt sich mit der Entwicklung einer oralen Vakzine auf Basis von Apx-Toxin produzierenden *Saccharomyces cerevisiae* und erhofft sich eine Induktion sowohl von systemischer als auch lokaler Schleimhautabwehr (Shin et al., 2013).

Die aktuelle Forschung nach optimierten Impfstoffen basiert vor allem auf der Entwicklung von attenuierten Lebendimpfstoffen (O'Neil et al., 2010). Im Zuge dessen erhofft man sich nicht nur eine bessere Kreuzimmunität sondern auch die Möglichkeit Markerimpfstoffe zu entwickeln, die eine Unterscheidung zwischen geimpften und akut oder chronisch erkrankten sowie besiedelten Tieren zulässt - sogenannte DIVA-Impfstoffe (Differentiating Infected from Vaccinated Individuals). In Nordamerika ist ein solcher Impfstoff auf Basis eines Kapselmutanten erhältlich (O'Neil et al., 2010).

Solange noch kein idealer Impfstoff verfügbar ist und beim Auftreten akuter Fälle ist man auf andere Maßnahmen wie den Einsatz von Antibiotika angewiesen (Jirawattanapong et al., 2008; Sjölund & Wallgreen 2010). Der vermehrte Einsatz von Antibiotika birgt allerdings zugleich die Gefahr der Selektion antibiotikaresistenter Stämme (White et al., 2002).

Mittlerweile wurde von ersten Antibiotikaresistenzen bezüglich *App* berichtet (Gutiérrez-Martín et al., 2006; Žutić et al., 2008). Zusätzlich besteht seitens der Verbraucher die Forderung nach Fleisch von gesunden, nicht antibiotika-behandelten Schweinen (van Oirschot, 1994). Dies unterstreicht die Notwendigkeit zur Entwicklung Antibiotika-unabhängiger Maßnahmen zur Beherrschung der porzinen Pleuropneumonie.

In diesem Kontext scheint die Suche nach natürlicher Krankheitsresistenz und deren Nutzung durch die moderne Tierzucht als lohnende Option. Zusätzlich würde man über die Zucht von resistenteren Tieren Schmerzen und Leiden reduzieren (Reiner, 2009).

## **2.2 Krankheitsresistenz**

Der Begriff Krankheitsresistenz umfasst die Summe all jener Faktoren, die zu einer verringerten Empfindlichkeit eines Individuums, einer Rasse oder Population beisteuern und so zur Verringerung der Folgen der jeweiligen Infektionskrankheit beitragen (Berge, 2008; Reiner, 2003). Im engeren Sinne bedeutet Resistenz jedoch nicht nur das Ausbleiben von klinischen Symptomen, sondern auch das Ausbleiben einer Infektion – eine absolute Unempfindlichkeit. Wohingegen der Begriff Toleranz die Fähigkeit des Wirts beschreibt die Folgen einer Infektion zu mindern, sodass es lediglich zur Ausprägung abgeschwächter Krankheitsanzeichen kommt (Bishop et al., 2010). Eine klare Unterscheidung zwischen Resistenz und Toleranz ist allerdings nicht immer möglich (Guy et al., 2012). So werden im weiteren Sinne die Begriffe Resistenz und Toleranz oft unter dem Begriff der Krankheitsresistenz vereint, es wird aber zwischen absoluter und relativer Resistenz unterschieden (Donaldson & Alexandersen, 2001; Vögeli et al., 1996a,b). Ein Beispiel für absolute Resistenz wäre beispielsweise das Fehlen eines Rezeptors ohne den das infektiöse Agens seinen Wirt nicht besiedeln kann (Vögeli et al., 1996a,b). Der Wirt ist somit absolut unempfindlich für das Pathogen. Zur relativen Resistenz tragen einerseits veränderte unspezifische anatomische und/oder physiologische Barrieren (Flimmerepithel, Schleimhaut, pH-Wert, usw.), sowie eine veränderte spezifische (B- und T-Lymphozyten, Antikörper) oder unspezifische Abwehr (Makrophagen, Zytokine, usw.) bei (Donaldson & Alexandersen, 2001).

Gesteigerte Resistenz gegenüber einem Pathogen führt zu reduzierter Erregervermehrung, Erregerausscheidung und folglich zum Rückgang von Krankheitsfällen. Da der

Infektionsdruck innerhalb einer Herde einer der Hauptgründe für die Verbreitung von Infektionskrankheiten von Tier zu Tier ist, führt auch allein eine erhöhte relative Resistenz zu einem verminderten Auftreten von Krankheitsfällen, verbesserter Produktivität und vermindertem Einsatz von Therapeutika (Reiner, 2009).

Genetische Unterschiede bezüglich Immunantwort sind sowohl für Labor- als auch für Haus- und Farmtiere belegt. Erhöhte Resistenz gegen Infektionskrankheiten könnte und kann durch Berücksichtigung dieses Merkmals in Zuchtprogrammen erzielt werden (Edfors-Lilja et al., 1994).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Krankheitsresistenz in Zuchtprogramme zu integrieren. Entweder über konventionelle Zuchtprogramme nach Zuchtwertschätzung, oder durch Selektionsprogramme basierend auf die „Marker-Assisted-Selection“ (MAS = Marker-gestützte-Selektion) (Kühn et al., 2008) bzw. genomischer Selektion (Pryce et al., 2014). Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, via Gentransfer günstige Genvarianten in das Genom einzubauen (Müller et al., 1992; Yan et al., 2014). Die genomische Selektion wird im Zuge der Entwicklung immer höherer Markerdichten zusehends beliebter. Sie ist eine effiziente und vergleichsweise kostengünstige Methode zur Abschätzung von Zuchtwerten (Ogutu et al., 2012). Im Gegensatz zur MAS in Zuge derer zuerst Marker für ein bestimmtes Merkmal erarbeitet und dann ins Zuchtprogramm integriert werden, bedient sich die genomische Selektion genomweiter Markerdaten. Im Allgemeinen sind dies so genannte SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (Bennewitz, 2009). Grundlage ist die Analyse der DNA einer Referenzgruppe mit bekanntem Phänotyp. Die simultanen Effekte aller erkannten SNPs werden geschätzt und statistisch in Bezug zum Phänotyp gesetzt, um den totalen genomischen Zuchtwert zu ermitteln (Ogutu et al., 2012).

Die Verbesserung der Krankheitsresistenz durch konventionelle Zuchtprogramme wird durch die meist relativ niedrigen Heritabilitäten der Merkmale für Resistenz erschwert ( $h^2 = 0,16-0,62$ ) (Hepp, 2006; Yonash et al., 2001). Eine Ausnahme stellen Untersuchungen zur allgemeinen Immunkompetenz von Edfors-Lilja und Kollegen (1994) dar. Hier konnten Heritabilitäten von bis zu 0,87 nachgewiesen werden. Als geeignetere Methode zur Aufnahme des Merkmals Krankheitsresistenz in die kommerzielle Tierzucht gelten MAS und genomische Selektion.

Die genetische Selektion auf Krankheitsresistenz hat einerseits das Ziel Tiere mit verbesserter Abwehrlage zu züchten, andererseits muss gleichzeitig sichergestellt werden, dass es keinen simultanen negativen Effekt auf Produktionsmerkmale gibt (Lunney, 2010). Die unerwünschte Kopplung zwischen Resistenzgenen und Genen mit negativen Auswirkungen auf den Leistungsphänotyp kann den Zuchteinsatz verkomplizieren. Ein Beispiel ist die rezeptorvermittelte Resistenz gegenüber *Escherichia (E.) coli* mit F18-Fimbrien. Eine enge Kopplung des Resistenzgens zur empfindlichen Variante des Maligne Hyperthermie Syndrom (MHS)-Gens schien die Zucht von F18-Coli resistenten und gleichzeitig stressresistenten Tieren zu erschweren (Meijerink et al., 1997). Spätere Studien an einer belgischen Population zeigten jedoch, dass im Gegensatz zur Schweizer Population von Meijerink et al. (1997) in dieser Population keine Kopplung zwischen F18-Coli-Resistenzgenen und der empfindlichen Variante des MHS-Gens besteht (Coddens et al., 2008). Inzwischen ist ein Multiplex DNA Microarray Chip entwickelt worden, der den gleichzeitigen Nachweis der verantwortlichen Gene für die Resistenz gegen F18-Coli und MHS-Empfindlichkeit ermöglicht. Zusätzlich erfasst dieser Test auch noch die Resistenzgene für F4-Coli und Influenza (Pastoret et al., 2012). Zusätzlich konnte von Huang et al. (2008) anhand einer taiwanesischen Population gezeigt werden, dass eine F18-Coli-Resistenz sich nicht negativ auf Leistungsmerkmale auswirkt. Diese Erkenntnisse eröffneten einerseits die Möglichkeit zur gleichzeitigen Selektion auf beide positiven Genvarianten und bietet andererseits eine Absicherung, dass wichtige Produktionsmerkmale weiterhin Bestand haben.

Beispiele für Krankheitsresistenzen sind mittlerweile für mehrere Erreger-Wirts-Interaktionen beschrieben und kommen bei fast allen Nutztieren vor (Cole, 1968; Heringstad et al., 2000; Reiner et al., 2002a, 2007, 2010). Teilweise basieren die Erkenntnisse bislang nur auf belegten Tier- und Populationsunterschieden. Andere Beispiele weisen eine komplette molekulare Aufklärung auf, oder sind bereits erfolgreich im Zuchteinsatz. In vielen Fällen hat Krankheitsresistenz einen polygenetischen Hintergrund, es sind allerdings auch Resistenzen mit Hauptgenwirkungen beschrieben. Je weniger Genorte zur Resistenz bzw. Empfindlichkeit beitragen, desto früher ist an einen Einsatz in der Praxis zu denken (Reiner, 2003).

### **2.2.1 Natürliche Krankheitsresistenzen bei Nutztieren**

Erste Anwendung und kommerzielle Nutzung natürlicher Krankheitsresistenz findet man in der Geflügelzucht. Hier wurden die Resistenzen gegen die Erreger der Marekschen Krankheit

und der aviären Leukose erfolgreich in Zuchtprogramme integriert (Cole, 1968). Zusätzlich wurden Kandidatengene für die Resistenz gegen Kokzidien erarbeitet (Hong et al., 2009).

Weitere wichtige „angewandte“ Krankheitsresistenzen zur Erhaltung der Produktivität und Gesundheit sind die Resistenz gegen gastro-intestinale Nematoden bei Schafen (Bisset et al., 2001), gegen Trypanosomen (Murray et al., 2000) und Zecken bei Rindern in tropischen Gebieten (Spickett et al., 1989; Rechav et al., 1990) sowie gegen Mastitis bei Milchkühen (Heringstad et al., 2000).

Unter den Schafen erwiesen sich die tropischen Rassen Red Massai, St. Croix, Florida Native und Barbados Blackbelly als resistenter gegen Nematodeninfektionen als europäische Rassen (Preston & Allonby, 1979; Courtney et al., 1985; Bisset et al., 2001). Vor dem Hintergrund weit verbreiteter Resistenzen der Parasiten gegen Anthelmintika, ist in einigen Regionen Australiens und im südlichen Afrika eine Schafproduktion ohne Berücksichtigung der natürlich vorkommenden genetischen Resistenz gegen gastro-intestinale Nematoden fast nicht mehr möglich (Berge, 2008; Stear & Wakelin, 1998).

In Skandinavien wird die Mastitisresistenz in Zuchtprogramme integriert indem man Zuchtbullen einen Zuchtwert für Mastitis zuordnet. Erhoben wird dieser anhand der klinischen Mastitiden ihrer Nachkommen. In Finnland und Schweden werden zusätzlich Abgänge aus dem Betrieb auf Grund von Euterproblemen berücksichtigt. In diesen Datensätzen war die Heritabilität von Mastitis höher als in Datensätzen ohne Berücksichtigung von Merzung (Heringstad et al., 2000). Mittlerweile wird auch den in Deutschland eingesetzten Bullen ein Zuchtwert für Eutergesundheit zugeordnet.

## **2.2.2 Natürliche Krankheitsresistenzen beim Schwein**

### **2.2.2.1 Allgemeine Immunkompetenz**

Während Resistenzen häufig Erreger-spezifisch sind, wirkt sich eine höhere allgemeine Immunkompetenz auf mehrere Erreger gleichzeitig aus.

Edfors-Lilja et al. (1994) forschten nach Unterschieden in der allgemeinen Immunkompetenz. Sie konnten beispielsweise Unterschiede in Leukozyten- und Granulozytenanzahl, Interferon- $\alpha$ - und Interleukin-2-Produktion festmachen. Gleichzeitig konnten sie anhand ihrer Testpopulation Heritabilitäten berechnen und so eine Vorhersage treffen, welches Merkmal sich als genetischer Marker eignet. Beispielsweise bewegen sich die Merkmale

Leukozytenzahl und Interleukin-2-Produktion im Bereich mittlerer Heritabilität (0,3-0,4), für die Granulozytenanzahl konnten sie eine relativ hohe Heritabilität von 0,87 berechnen, was auf einen Einzelgeneffekt hinweisen könnte.

In Selektionsprogrammen war es möglich (anhand von High- und Low-Respondern nach Immunstimulation durch Impfung) sowohl eine Steigerung der Immunantwort und dabei gleichzeitig auch gesteigerte tägliche Zunahmen zu erzielen (Mallard et al., 1992 & 1998; Wilkie et al., 1998). Obwohl die Hintergründe nicht weiter erforscht wurden, wurde vermutet, dass die Variationen sowohl für die angeborene als auch für die erworbene Immunantwort polygenetischen Ursprungs sind. In Kanada bestehen mittlerweile Zuchtprogramme basierend auf High- und Low-Immune-Respondern (Wilkie & Mallard, 1999; Reiner, 2003).

Die Arbeitsgruppe um Wimmers konnte im Jahre 2008 anhand einer Duroc-Miniaturschwein-Kreuzungsfamilie Interleukin 12 als mögliches Kandidatengen für Immunkompetenz erarbeiten. Nach Impfung konnten sie 3 SNPs detektieren, einer in der Promotorregion und zwei in einem Intron des Gens. Diese Interleukin 12-Genotypen hatten signifikante Effekte auf die Komplementaktivität und Leukozytenproliferation. In einer darauffolgenden Auswertung war es ihnen zusätzlich möglich, QTL in Verbindung mit humoraler Immunantwort zu detektieren (Wimmers et al., 2009).

Die aktuelle Forschung und die Suche nach SNPs konnte neue Kandidatengene aufdecken. Yang et al. (2012) berichten von einem Polymorphismus im porzinen TLR-4-Gen und vermuten einen Zusammenhang mit Krankheitsempfänglichkeit bzw. -resistenz. Schon vorher entdeckten Shinkai et al. (2006) SNPs in TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 und TLR-6. Als anderer möglicher molekularer Marker für die Selektion auf verbesserte Immunantwort wurde das für NRAMP1 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1) kodierende Gen erkannt (Ding et al., 2014). Sie konnten einen SNP in diesem Gen in Zusammenhang mit Immunmerkmalen wie Leukozytenzahl oder Gehalt an Zytotoxin in Monozyten setzen. Eine neue Studie postuliert die besondere Eignung des Gens NOD1 (Nucleotide-binding oligomerization domain 1) als Marker (Shinkai et al., 2015). Dieses Gen kodiert für einen Rezeptor, der mikrobielle Strukturen erkennt und bindet. Sie detektierten zwei SNPs in diesem Gen, die für eine verminderte Immunantwort verantwortlich sind. Beide SNPs werden rezessiv vererbt. Die Autoren vermuten daher eine hohe Frequenz dieser unfavorisierten Allele in der Schweinepopulation.

Eine genomweite Assoziationsstudie aus dem Jahr 2013 konnte insgesamt 32 signifikante SNPs mit den vier Merkmalen Interferon (IFN)- $\gamma$  und Interleukin 10 (IL-10) Level, das Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-10 und Immunoglobulin G (IgG) detektieren (Lu et al., 2013).

Insgesamt 17 der signifikanten SNPs fallen in Bereiche von zuvor erarbeiteten QTL für Immunmerkmale. Einige QTL sind sogar verantwortlich für das Merkmal, das in dieser Studie untersucht wurde (Lu et al., 2013). Beispielsweise liegen drei signifikante SNPs für IFN- $\gamma$ -Konzentration im Bereich des QTL für IFN- $\gamma$  auf SSC11. Dasselbe Prinzip besteht für das Merkmal IL-10 auf SSC5 und IgG Level auf SSC2 (Lu et al., 2011).

### 2.2.2.2 Resistenz gegen spezielle Infektionskrankheiten

#### Escherichia coli bedingte Diarrhoe

Vorzeigebeispiel für die Resistenz gegen eine spezielle Infektionskrankheit ist die genetische Resistenz gegenüber einigen pathogenen *E. coli-Pathovaren*. Die molekularen Grundlagen für die Resistenz sind fast vollständig geklärt und entsprechende Gentests für die Nutzung zur Resistenzzucht entwickelt.

Für die intestinale Infektion mit *E. coli* ist eine Anheftung der Bakterien mittels spezifischer adhäsiver Fimbrien an die Darmschleimhaut obligat. Die Adhäsion ist eine spezifische Interaktion zwischen diesen Fimbrien der Bakterien und Rezeptoren in der Dünndarmschleimhaut (Bertschinger & Fairbrother, 1999). Nach der Adhäsion wird die Vermehrung der Bakterien auf der Darmschleimhaut möglich, wobei es zur Freisetzung von Enterotoxinen oder Zytotoxinen kommt (Rampoldi et al., 2011). Fehlen entsprechende Rezeptoren in der Dünndarmschleimhaut ist der Wirt resistent.

Enterotoxin- bzw. Shigatoxin-bildende *E. coli* mit F18-Fimbrien verursachen die Coli-Diarrhoe bzw. die Ödemkrankheit bei Absatzferkeln (Meijerink et al., 1997). Sie kommt bei bis zu 40 % der Ferkel vor und kann bei bis zur Hälfte der Fälle auch zum Tod führen (Imberechts et al., 1992). Eine Kontrolle dieser Erkrankungen ist von hoher wirtschaftlicher Bedeutung und Zuchtanstalten versuchen empfindliche Tiere aus ihrer Zucht zu eliminieren (Bao et al., 2008). Der Genlocus für den F18-Rezeptor wurde auf Chromosom 6 kartiert (Vögeli et al., 1996a,b). Verantwortlich für die Resistenz ist höchstwahrscheinlich eine Mutation im FUT1( $\alpha$ -(1,2)-Fucosyltransferase)-Gen, sie erweist sich als eng gekoppelt mit dem Gen für den F18-Rezeptor aber auch mit dem Locus für Stressanfälligkeit. Die Resistenz wird rezessiv vererbt (Meijerink et al., 1997).

Enterotoxische *E. coli* (ETEC) mit Fimbrien der F4-Familie sind eine der Hauptursachen für Durchfälle bei Saug- und Absatzferkeln (Rampoldi et al., 2011). F4-Fimbrien existieren in drei verschiedenen Varianten (F4ab, F4ac, F4ad), wobei F4ac am häufigsten vorkommt. Die Resistenz gegen die Adhäsion von ETEC F4ab/F4ac wird autosomal rezessiv vererbt. Das F4-

Rezeptorgen liegt auf Chromosom 13 (Edfors-Lilja, 1995). Genauere Untersuchungen von Rampoldi und Kollegen (2011) ergaben eine Position zwischen dem LMNL (Leishmanolysin-like Gen)-locus und Mikrosatellit S0293. Als mögliches Kandidatengen wurde zunächst das Mucin 4 (MUC4) erarbeitet (Erickson et al., 1994; Jørgensen et al., 2003), später berichten Fu et al. (2012) von der Entdeckung weiterer zwei vielversprechender Kandidatengen (HEG1 und ITGB5).

Für beide Rezeptorvarianten gibt es Gentests, die in der Praxis für die Züchtung resistenter Schweine genutzt werden.

### **Weitere bakterielle Infektionskrankheiten**

Daneben gibt es noch weitere Beispiele für Resistenzen gegenüber bakteriellen Erregern. Cameron und Kollegen beschreiben Anfang der 1940er Jahre eine Resistenz gegen *Brucella suis*. Nicht viel später konnte eine Schweinelinie mit Resistenz gegen den akuten und chronischen Verlauf von Rotlauf gezüchtet werden (Hutt, 1958). Desweiteren gibt es Berichte über züchterisch genutzte Resistenzen gegen Leptospiren (Przytulski & Porzeczowska, 1980) und Resistenzen gegen *Brachyspira hyodysenteriae*, *Eperythrozoonose*, Klassische Schweinepest (Hutt, 1958) und *Staphylococcus aureus*-Infektionen (Lacey et al., 1989). Eine Resistenz gegen Salmonellose begründet ein Gen (NRAMP) auf Chromosom 15 (Blackwell, 1996; Tuggle et al., 1997).

### **Virale Infektionskrankheiten**

Mittlerweile sind für eine Reihe von Infektionskrankheiten genetische Variationen der Resistenz/Empfindlichkeit entdeckt worden.

Eine frühe Studie aus dem Jahre 1976 (Mengeling & Cutlip) stellte Resistenzunterschiede zwischen Rassen bezüglich des *Hämagglutinierenden Enzephalomyelitisvirus* fest. Die zugrunde liegende genetische Variation konnte allerdings nicht eruiert werden.

In Pinselohr- und Warzenschweinen findet im Vergleich zu Hausschweinen eine geringere Virusreplikation des *Afrikanischen Schweinepestvirus* statt. Für diese relative Resistenz wird eine vermehrte Lysis von Virus-befallenen Makrophagen verantwortlich gemacht (Martins et al., 1993; Oura et al., 1998). Wissenschaftler des Roslin-Institutes entwickelten kürzlich das genetisch modifizierte Schwein „pig26“. Eine neue Technologie, die nicht das Genom einer somatischen Zelle sondern das Genom direkt in der Zygote verändert, wurde zum ersten Mal erfolgreich an einem landwirtschaftlichen Nutztier angewandt. Die Entwicklung von „pig26“

war der erste Schritt im Rahmen eines Projekts zur Etablierung von resistenten Schweinen gegenüber der Afrikanischen Schweinepest (Lillico et al., 2013).

Bezüglich der Klassischen Schweinepest wurde ein SNP im FcRn (Neonatal Fc receptor)-Gen mit Höhe des Antikörpertiters assoziiert und wird als möglicher Marker für Zuchtprogramme auf erhöhte Resistenz diskutiert (Yang et al., 2012). Eine *in vitro*-Studie konnte die Virusreplikation mittels porcinem Mx1-Protein hemmen (He et al., 2014). Einer anderen Forschergruppe gelang es in Schweinen mittels Gentransfer eine Überexpression an Mx-1-Proteinen zu induzieren. (Yan et al., 2014). Zellen dieser transgenen Linie waren in einem *in vitro*-Versuch gegen das Virus geschützt.

Rothschild und Kollegen (1984b) konnten nach Impfung mit dem *Pseudorabies-Virus* rassespezifische Unterschiede in der Höhe des Impfantikörperspiegels feststellen. Später wurde durch Edfors-Lilja et al. (1998) bei Wildschweinen nach Infektion eine höhere Interferon- $\alpha$ -Produktion verzeichnet. Darüber hinaus konnten anhand einer Kreuzungsfamilie aus Edelschwein und chinesischem Meishan QTL für die Resistenz gegenüber der Aujeszkyschen Krankheit kartiert werden (Reiner et al., 2002).

Bezüglich der Maul- und Klauenseuche zeigen Schweine im Vergleich zu Wiederkäuern eine relative Resistenz. Es wurde die minimale aerosole Infektionsdosis bestimmt. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass Schweine zwar potente Ausscheider, aber nicht sehr empfindlich für eine luftgetragene Infektion sind (Donaldson & Alexandersen, 2001).

### **Parasitäre Infektionen**

Bislang wird vor allem von Resistenzen gegen Nematoden berichtet. Natürliche Resistenzen gegen die Darmparasiten *Strongyloides* und *Ascaris suum* waren schon in den 1970er Jahren bekannt (Wakelin, 1978). Etwa zehn Jahre darauf wurde von einer Resistenz gegen *Trichinella spiralis* bei Minischweinen berichtet (Lunney & Murrel, 1988). Diese beruht auf einer Zersetzung enzystierter Muskellarven und konnte mit Genen des MHC-Komplexes assoziiert werden (Madden et al., 1990 & 1993). Später wurden Resistenzunterschiede gegenüber *Ascaris suum* bestätigt (Nejsum et al., 2006) und QTL detektiert (Skallerup et al., 2012). Gleichzeitig wurde festgestellt, dass sich resistente Tiere gegen *Ascaris suum* auch resistenter gegenüber *Trichuris suis* zeigen (Nejsum et al., 2006).

Neben den genannten Nematodenresistenzen gibt es auch Anhaltspunkte für eine angeborene Resistenz gegen den Bandwurm *Taenia solium* (Sciutto et al., 2003) und eine Studie aus 2002

(Reiner et al., 2002b) konnte Resistenzunterschiede nach Infektion mit *Sarcocystis miescheriana* aufdecken.

### **2.2.2.3 Resistenz gegen Atemwegserreger**

#### **Allgemeine Lungengesundheit**

Als möglicher Marker für Lungengesundheit wurde das Surfactant-Associated Protein (SFTPA1, SP-A) untersucht. Eine aktuelle Studie hierzu konnte in diesem Gen einen Polymorphismus finden, der mit dem Grad an Lungenschädigung assoziiert ist. Untersucht wurden Lungenschäden anhand eines etablierten Modells für akute Lungenschädigung nach Injektion einer Noxe. Die Verfasser leiten aus ihren Ergebnissen ab, dass dieser Polymorphismus sich als potentieller Marker für die Zucht in Hinblick auf eine verbesserte Lungengesundheit erweisen könnte (Zhang et al., 2014).

Der Haupthistokompatibilitäts (MHC)-Komplex (auch Swine Leukocyte Antigen (SLA) genannt) ist eine hochpolymorphe Region auf dem Genom und umfasst eine Vielzahl an verschiedenen Allelen. Es ist bekannt, dass der MHC-Komplex unter anderem verschiedene Immunmerkmale, Krankheitsresistenz und auch die Impfantwort beeinflusst (Gao et al., 2014). Beispielsweise werden für die unterschiedliche Immunreaktionen auf Infektion mit *Bordetella bronchiseptica* verschiedene (MHC)-Haplotypen (Rothschild, 1984a) als ursächlich angesehen. Neuere Studien konzentrieren sich darauf die SLA-Alleldiversität zu verstehen und zu identifizieren. Man verspricht sich davon ein tieferes Verständnis der adaptiven Immunantwort und Fortschritte in der Impfstoffentwicklung (Gao et al., 2014; Pedersen et al., 2014).

#### **Influenza**

Für die angeborene Resistenz gegenüber Influenzaviren wird den antiviralen Mx1-Proteinen eine große Bedeutung zugesprochen (Haller et al., 1998). Verschiedene natürlich auftretende Allelvarianten am Mx1-Locus sind mit einer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber den Influenzaviren assoziiert (Nakajima et al., 2007; Palm et al., 2007). Yau et al. (2014) konnten zeigen, dass eine vermehrte Expression an Mx1-Proteinen die Zellen vor Influenzaviren schützt. Weitere Untersuchungen konnten aufzeigen dass die antivirale Wirkung der Mx-Proteine in einer frühen Hemmung der viralen Genexpression und Genomreplikation begründet ist (Palm et al., 2010).

### **Porzines Circovirus Typ2**

In Bezug auf Infektion mit dem *Porzinen Circovirus Typ2* konnte eine Prädisposition von Schweinen der Landrasse im Vergleich zu Duroc und Edelschwein nachgewiesen werden (Opriessnig et al., 2006). Eine darauffolgende Studie von Opriessnig et al. (2009) konnte einen genetisch basierten Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber diesem Virus zwischen den Rassen Piétrain und Landrasse aufzeigen und damit die Ergebnisse von Lopez-Soria et al. (2004) bestätigen.

### **Mykoplasmen**

Auch bezüglich Mykoplasmenresistenz wird von rassebedingten Unterschieden berichtet (Hua et al., 2014). Eine andere Studie belegt, dass eine gleichzeitige Selektion auf Produktionsmerkmale wie tägliche Zunahmen und Rückenfettdicke sowie Mykoplasmenresistenz möglich ist (Kadowaki et al., 2012). Eine weitere Studie zeigte Unterschiede im Level von Wachstumshormon und Interferon- $\gamma$  zweier Zuchtlinien nach Mykoplasmenimpfung. Obwohl die Hintergründe weiterhin unklar bleiben, könnten diese beiden Merkmale bei der Zucht auf verbesserte Mykoplasmenresistenz hilfreich sein (Shimazu et al., 2014).

### **Porzines Respiratorisches und Reproduktives Syndrom Virus**

Eine Vielzahl an Studien gibt es zum *PRRSV*. Dieses Virus verursacht erhebliche ökonomische Verluste in der Schweineproduktion. Erste Hinweise auf eine vorliegende Resistenz gegen den Erreger wurden von Halbur et al. (1998) aufgezeigt. Sie konnten nach Infektion mit einem hochvirulenten Stamm rassespezifische Unterschiede zwischen Hampshire, Duroc und Meishan feststellen und so den ersten Schritt zur möglichen Zucht weniger anfälliger Schweine gehen. Ein weiterer Hinweis kam durch eine *in vitro*-Studie, die im Vergleich zwischen Edelschwein und Duroc-Pietrain-Kreuzung, in Edelschweinen eine signifikant höhere Anzahl von *PRRSV*-infizierten Makrophagen nachweisen konnte (Vincent et al., 2005). In einer darauffolgenden *in vivo*-Studie von Vincent et al. (2006) wurde in einem frühen Stadium der Infektion eine schwerere klinische Symptomatik bei der Duroc-Pietrain-Linie gefunden, 21 Tage p.i. hatten Edelschweine jedoch die deutlich höheren Serum-Virus-Titer. Petry und Kollegen (2007) konnten Interleukin 8 als mögliches Kandidatengen erarbeiten. Nach phänotypischer Beurteilung post-infectionem wurden Tiere als Low- bzw. Highresponder klassifiziert. Low-Responder-Tiere hatten vor der Infektion einen signifikant höheren Interleukin 8-Serumspiegel als High-Responder. Später wurden mit weiteren

Analysen noch weitere Kandidatengene durch Bates et al. (2008) hinzugefügt. Bezüglich Interleukin 8 konnte eine *in vitro*-Studie aus dem Jahre 2007 bei Landrasse-Schweinen eine erhöhte Produktion feststellen, diese war assoziiert mit verringerter Virusreplikation in Makrophagen und erhöhter TNF $\alpha$ -Produktion (Ait-Ali et al., 2007).

Zusätzlich wurde in einem Infektionsversuch von Reiner et al. (2010) bei Miniaturschweinen im Vergleich zur Rasse Piétrain eine kürzere Virämie, ein geringere Virusbürde und keine persistierenden Viren nachgewiesen. Eine Studie aus dem Jahr 2014 (Xing et al., 2014) belegt Resistenzunterscheide zwischen einer Duroc-Landrasse-Yorkshire-Kreuzung (DLY) und einer ursprünglichen chinesischen Rasse. Die DLY-Kreuzungstiere zeigten im Infektionsversuch einen deutlich ausgeprägteren klinischen Verlauf. Blutuntersuchungen zeigten bei den DLY-Tieren sowohl ein höheres Level an CD4(+)-Zellen als auch ein höheres Verhältnis von CD4(+)/CD8(+)-Zellen. Außerdem hatten Tiere der DLY-Kreuzung einen höheren IL-10- und TNF- $\alpha$ -Blutspiegel, aber geringere IFN- $\gamma$ -Level. Zusätzliche vergleichende Expressionsstudien enthüllten das TF-Gen und USP18 (Ubiquitin Specific Protease 18) als mögliche Marker für Resistenz bzw. Empfindlichkeit. In weiterführenden Untersuchungen an der gleichen Untersuchungsgruppen konnte die Rolle von USP18 als möglicher DNA-Marker bestätigt werden. Im Promotor des USP18 Gens wurde ein SNP detektiert der maßgeblich die Transkription reguliert (Li et al., 2014). Gleichzeitig enthüllte die Suche nach SNPs in Genen, die für Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen kodieren, dass bestimmte Genotypen mit erhöhter Resistenz einhergehen (Ren et al., 2012).

Positionelle und genomweite Assoziationsstudien zeigen, dass die *PRRSV*-Resistenz zwar von vielen Regionen auf dem Genom beeinflusst wird, aber maßgeblich von einer Region auf SSC 4 kontrolliert wird (Boddicker et al., 2012; 2014). Diese genomische Region liegt in Nachbarschaft zu einer Gruppe von Genen für das angeborene Immunsystem. Zusätzlich war diese Region auch mit verbesserten Tageszunahmen bei infizierten Tieren assoziiert. Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit zur Zucht auf resistenterere Tiere bei gleichzeitigem Erhalt des Leistungsmerkmals (Rowland et al., 2012).

### ***Actinobacillus pleuropneumoniae***

Anhand von Infektionsversuchen mit *App* konnten deutliche Resistenzunterscheide zwischen den Rassen Deutsche Landrasse, Piétrain, Hampshire und Large White aufgezeigt werden (Hoeltig, 2008; Hoeltig et al., 2009). Nach Infektion wurden die Tiere anhand eines neu entwickelten Respiratory Health Score (RHS) beurteilt. Der RHS berücksichtigt klinische, sonographische und radiologische Parameter. Tiere der Rasse Hampshire erwiesen sich als

besonders resistent, während Piétrain und Deutsche Landrasse sich als empfindlich zeigten. Todesfälle traten allerdings nur bei Schweinen der Deutschen Landrasse auf (Hoeltig et al., 2008). Da von der Pathogenese der porzinen Pleuropneumonie die bedeutsame Rolle der Eisenbeschaffung bekannt war, wurde daraufhin nach Polymorphismen im Transferrin-Gen gesucht. Es war möglich bei Tieren der Landrasse bestimmte Transferrin-Genotypen mit der Schwere der Erkrankung zu assoziieren (Danilowicz et al., 2009).

Eine Proteomstudie (Kahlisch et al., 2009) und eine Studie, die nach Korrelationen zwischen Immunmarkern und der Schwere der Erkrankung suchte (Benga et al., 2009), konnte die relative Resistenz von Hampshire und die relative Empfänglichkeit von Landrasse-Schweinen belegen. In beiden Studien erwies sich das akute-Phase-Protein Haptoglobin als möglicher Marker für Krankheitsresistenz. Die Rasse Hampshire zeigte sich hier mit niedrigsten Haptoglobinkonzentrationen als am meisten resistent (Benga et al., 2009; Kahlisch et al., 2009). Zusätzlich entdeckte die Studie von Kahlisch und Kollegen weitere potentielle Marker. Ein hoher FetuinA-Spiegel bei gleichzeitig niedrigen Leveln eines Surfactant-assoziierten Proteins (SP-D) war bei der Rasse Hampshire mit der Absenz von Lungenläsionen assoziiert. FetuinA wirkt sich negativ auf neutrophile Granulozyten aus. Die Autoren folgern, dass dadurch ein initial überschießender „respiratorischer/oxidativer burst“ verhindert wird und somit wirtseigenes Gewebe geschont wird. Benga et al. (2009) konnten eine verzögerte Neutrophileninfiltration bei Tieren der Rasse Hampshire bestätigen.

Trotz dieser Vielzahl an Erkenntnissen zur genetischen Variation der Krankheitsresistenz, wird dieses Merkmal bislang nur begrenzt in die Selektionszucht beim Schwein integriert. Ein Grund hierfür ist die Schwierigkeit die für die Resistenz verantwortlichen Gene zu finden. Die QTL-Analyse ist ein erster Schritt zum Auffinden der verantwortlichen Loci.

## **2.3 *Quantitative Trait Loci (QTL)***

### **2.3.1 Hintergrund**

Für die moderne Tierzucht und -haltung interessante Merkmale sind in der Mehrzahl quantitativ verteilt (Hayes & Goddard, 2001). Quantitative Merkmale (bspw. Gewicht, Größe) sind messbar, zeigen eine kontinuierliche Veränderung und es gibt keine Merkmalsalternative. Wohingegen qualitative Merkmale (bspw. Fellfarbe weiß oder rot) als

diskret bezeichnet werden, da sie nur sich gegenseitig ausschließende Werte annehmen („entweder-oder“) (Lynch & Walsh, 1998). Quantitative Merkmale haben einen polygenetischen Hintergrund. Sie werden von einer zunächst unbekanntem Anzahl an QTL kontrolliert und unterliegen zusätzlich Umwelteinflüssen

Ein QTL ist definiert als ein chromosomaler Abschnitt, der ein oder mehrere das Merkmal beeinflussende Gene enthält (Masle, 2007). Die QTL-Analyse ist die zugehörige statistische Methode, um die genetische Architektur quantitativer Variation zu erforschen. Das Ziel ist, jene chromosomalen Abschnitte zu finden, die zur Variation beitragen. Anhand einer informativen Tierfamilie wird versucht, die Kopplung zwischen phänotypischer Merkmalsausprägung und genetischen Daten (molekulare Marker) nachzuweisen und so an der Variation beteiligte Regionen auf dem Chromosom zu finden.

Ziel ist es nicht nur den Ort der QTL, sondern auch deren Anzahl und deren Anteil an der Merkmalsausprägung zu bestimmen (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). Denn gerade auch mit Hinblick auf den späteren züchterischen Einsatz ist es ein grundlegendes Ziel der Analyse die Frage zu beantworten, ob die phänotypische Variation auf wenigen Loci mit großem Effekt, oder vielen Loci mit jeweils kleinen Effekten beruht (Miles & Wayne, 2008). Ergebnisse aus der QTL-Analyse liefern somit eine erste, wichtige Orientierungshilfe für weitere Untersuchungen bezüglich der zu Grunde liegenden Genvarianten.

Neuere Umsetzungen der QTL-Analyse weiten den Begriff „Phänotyp“ aus. Statt einem klassischen phänotypischen Merkmal, das den gesamten Organismus betrifft, wird nun beispielsweise die Menge an RNA-Transkript (expression oder e-QTL) oder die Menge an produziertem Protein (protein QTL oder p-QTL) als Phänotyp definiert (Damerval et al. 1994; Schadt et al. 2003). Das zu Grunde liegende Prinzip bleibt jedoch bestehen: Auffinden von Loci durch Co-Segregation von Merkmal mit Markern (Miles & Wayne, 2008). Die QTL-Kartierung ist auf diesen neuen Kontext übertragbar, da auch diese Merkmale meist polygenetisch sind. Die Kombination von klassischen QTL- mit e-QTL-Analysen vereint die Suche nach Kandidatengenen auf positioneller Ebene und funktioneller Ebene. Dies verspricht einen noch tieferen Einblick in die genetische Struktur komplexer Merkmale und somit auch ein tieferes Verständnis für die Entstehung von Krankheiten (Hubner et al. 2006). Die Idee ist, dass differentiell exprimierte Kandidatengene, welche gleichzeitig als QTL auf

ihrer chromosomalen Position detektiert werden, ein besonderer Status zukommt (Drake et al., 2006).

### **2.3.2 Durchführung der QTL-Analyse**

Für die erfolgreiche Durchführung einer QTL-Kartierung sind folgende Bausteine unabdingbar (Falconer & Mackay, 1996; Haley & Andersson, 1997):

- Geeignetes Tiermodell (Ausgangslinien müssen sich im betrachteten Merkmal hinsichtlich Phäno- und Genotyp unterscheiden)
- Standardisierte Aufzucht, Infektion und exakte Phänotypbestimmung (Reduktion der Umwelteinflüsse)
- Genmarker und Genkarten (die zwischen den Ausgangslinien unterscheiden können)
- passende statistische Verfahren

### **2.3.3 Tiermodell und Familiendesigns**

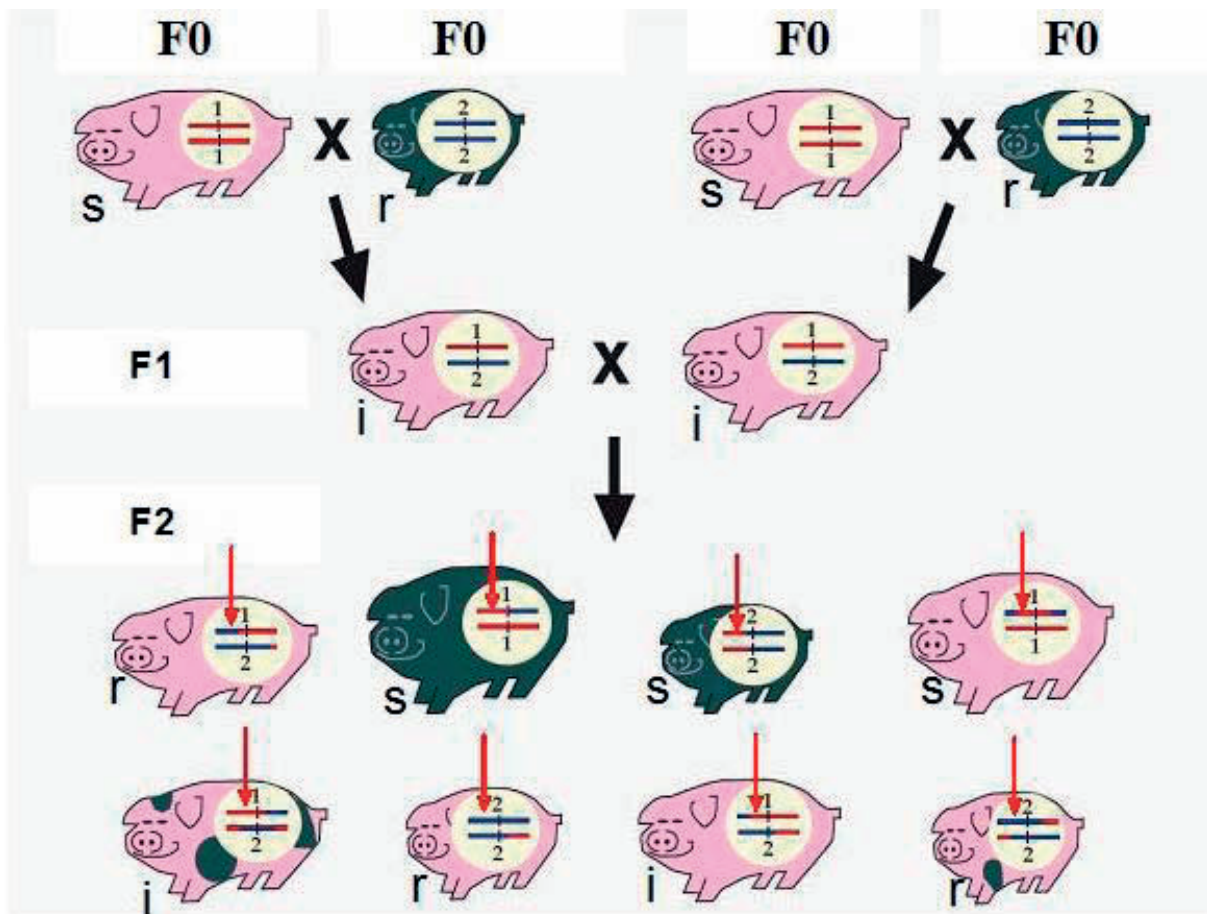
Als Grundlage der QTL-Analyse bei Nutztieren dient ein informatives Tiermodell. Dies ist Voraussetzung, um Zusammenhänge zwischen beobachteten Phänotypen und genetischen Markern zu erkennen.

#### **2.3.3.1 F<sub>2</sub>- und Back-Cross-Familien**

Es werden zwei oder mehr Ausgangslinien gewählt, die sich hinsichtlich des Zielmerkmals sowohl in ihren Allelen als auch phänotypisch eindeutig unterscheiden. Hieraus entstehende Familien sind durch die Vielzahl an segregierenden Marker-Allelen besonders informativ (Haley & Andersson, 1997). Beispiele sind Kreuzungen zwischen Wildschwein und Hausschwein (Andersson et al., 1994) oder zwischen asiatischen und europäischen Schweinerassen (Reiner et al., 2002a; 2007).

Eine Ausnahme bilden Merkmale, die von Dutzenden oder gar Hunderten von Genen kontrolliert werden. Hier können die Ausgangslinien annähernd denselben Phänotyp aufzeigen und sich einfach hinsichtlich der enthaltenen Allele unterscheiden. Diese werden dann in den folgenden Generationen neu zusammengesetzt und lassen ein Sortiment an Phänotypen entstehen (Miles & Wayne, 2008).

Im klassischen Falle werden bei der Analyse quantitativer Merkmale Referenzpopulationen verwendet. Dies sind beim Schwein sogenannte F<sub>2</sub>- oder BC (Back-Cross)-Familien. Hierfür werden zwei hinsichtlich des fraglichen Merkmals phäno- und genotypisch divergierende Ausgangslinien gekreuzt. Die entstehende F<sub>1</sub>-Generation wird entweder *inter se* gekreuzt oder mit einem Tier aus einer der Ausgangsrassen der Parentalgeneration rückgekreuzt, um eine rekombinante F<sub>2</sub>-Generation (Abbildung 1) bzw. BC-Generation zu erhalten (Falconer & Mackay 1996; Haley & Andersson 1997; Lynch & Walsh, 1998). Wobei das F<sub>2</sub>-Modell zu favorisieren ist, da es sich laut Haley & Andersson (1997) besser zur Ermittlung von QTL und der Abschätzung von additiven und dominanten Effekten eignet. Für eine aussagekräftige Studie wird eine Tierzahl von mindestens 100 Individuen in der F<sub>2</sub>-Generation benötigt (Broman et al., 2001).



**Abbildung 1:** F<sub>2</sub>-Familiendesign: Kreuzt man Tiere mit bekannten, aber unterschiedlichen Phänotypen (s: sensibel, r: resistent) aus zwei Founderpopulationen (F<sub>0</sub>), so entsteht eine einheitliche (i: intermediär) erste Filialgeneration (F<sub>1</sub>). Erst wenn man Tiere dieser homogenen F<sub>1</sub>-Generation wieder miteinander verpaart, entsteht eine informative zweite Filialgeneration (F<sub>2</sub>) in der es durch *Crossing-Over* zur freien Verteilung der großelterlichen Allele kommt (Reiner, Vortragsunterlagen).

Anhand der segregierenden  $F_2$ -Generation erfolgen dann die exakte Geno- und Phänotypenbestimmung, die Erstellung einer genetischen Karte und anschließend die QTL-Berechnungen. Wenn an einer bestimmten Stelle im Genom möglichst viele  $F_2$ -Tiere, die beide Allele von der empfindlichen Founderrasse erhalten haben, sich auch im Infektionsversuch empfindlich zeigen, und sich dasselbe Prinzip auch für mischerbige Tiere und resistente Tiere darstellt, ist der QTL identifiziert (Hoeltig et al., 2013).

### **2.3.3.2 Daughter-, Granddaughter-Design und selektives DNA-Pooling**

Während beim Schwein die Erstellung einer experimentellen Tierfamilie ein etabliertes Verfahren darstellt, findet man dies beim Rind nur selten (Masle, 2007). Hier kommt meist das Daughter Design (DD), dessen Weiterentwicklung das selektive DNA-Pooling oder das Granddaughter Design (GDD) (Lipkin et al, 1998; Weller et al. 1990) zur Anwendung.

Beim DD basieren die Untersuchungen auf den Töchtern eines für einen genetischen Marker heterozygoten Bullen. Diese werden genotypisiert und anhand ihres vom Vater geerbten Markerallels in zwei Gruppen eingeteilt. Besteht eine phänotypische Varianz zwischen den beiden Gruppen, schließt man daraus, dass der Bulle auch für einen gekoppelten QTL heterozygot ist. Das DD erfordert eine hohe Probenanzahl, um eine ausreichende statistische Sicherheit aufzuzeigen (Darvasi & Soller, 1992). Um die benötigte Probenmenge zu reduzieren wurde dieses Design weiterentwickelt (Lipkin et al, 1998).

Beim selektiven DNA-Pooling wird die DNA von Töchtern mit extremen Phänotypwerten berücksichtigt. Es werden zwei Gruppen gebildet, in zwei entsprechende DNA Pools aufgeteilt und anschließend gemeinsam genotypisiert (Lipkin et al, 1998). Als Hinweis auf eine Kopplung zwischen Marker und Phänotyp wird die unterschiedliche Allelfrequenz zwischen den beiden Gruppen angesehen.

Sehr erfolgreich und mit geringerer Probenanzahl als das DD durchzuführen, ist das QTL-Kartieren anhand des GDD (Schulmann et al., 2009; Ashwell et al., 2005). Es werden die Söhne eines Bullen genotypisiert und die Phänotypen anhand der Enkeltöchter (Granddaughter) bestimmt. Die Söhne des heterozygoten Bullen werden wieder anhand ihrer ererbten Allele in zwei Gruppen aufgeteilt und für die dazugehörigen Enkeltöchter die Phänotypen aufgenommen (Weller et al., 1990). Analog zum DD wird auch hier versucht einen Zusammenhang zwischen erhaltenem Allel vom (in diesem Falle) Großvater und phänotypischer Varianz nachzuweisen.

### 2.3.4 Aufzucht, Infektion und Phänotypbestimmung

Der beobachtete Phänotyp ist ein Zusammenspiel aus genetischen Komponenten (G) und Umwelteinflüssen (U). Wobei der Genotyp noch weiter in additive, dominante und epistatische Effekte (E) unterteilt werden kann (Lynch & Walsh, 1998).

$$P = G + U = (\text{additive E} + \text{dominate E} + \text{epistatische E}) + U$$

Im vorliegenden Fall hat die QTL-Analyse zum Ziel, die genetische Komponente des Merkmals „Krankheitsausprägung“ zu bestimmen. Neben einer exakten Phänotypenbestimmung ist es essentiell, die unterschiedlichen Umwelteinflüsse so weit wie möglich zu reduzieren. Möglich wird dies durch standardisierte Aufzucht, Haltung und Infektion. Wenn zwei Populationen trotz standardisierter Aufzucht unterschiedliche Phänotypen zeigen, kann man von einer genetischen Grundlage für diese Variation ausgehen (Broman, 2001).

### 2.3.5 Genmarker

DNA-Polymorphismen mit bekannter Position auf dem Genom bezeichnet man als Marker. Geeignete Marker für die genetische Kartierung müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Sie sollten anonym, also ohne funktionelle Bedeutung sein und keiner genetischen Funktion zuzuordnen sein und gleichmäßig über das gesamte Genom verfügbar sein. Sie müssen segregierende Allele aufweisen und es ermöglichen die Varianten der Ausgangslinien und stattgefundenen Rekombinationen zweifelsfrei und möglichst einfach nachzuweisen. Das setzt einen hohen Grad an Polymorphismus voraus (Goldstein & Schloetterer, 1999; Pompanon et al., 2005, Wolz, 1993).

Historisch gesehen waren geeignete Marker oft der limitierende Faktor für eine erfolgreiche genetische Kartierung (Wolz, 1993). Erst als Botstein et al. 1980 den Anstoß gaben Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen (RFLP's) als genetische Marker zu nutzen, erfuhr die genetische Kartierung einen Aufschwung. RFLP's basieren auf variablen Schnittstellen von Enzymen. Zahlreiche solcher Schnittstellen wurden entdeckt und im Zuge dessen die erste komplette genetische Karte des Menschen erstellt (Donis-Keller et al., 1987). Die meisten RFLP's haben allerdings nur zwei Allele (Nakamura et al., 1987) und somit einen geringen Informationsgehalt. Die Suche nach geeigneten Markern ging weiter.

Die von Nakamura et al., 1987 beschriebenen VNTR's (Variable Number of Tandem Repeats) sind Abschnitte auf dem Chromosom mit Wiederholungen einer DNA-Sequenz. Später teilte man sie in Mini- und Mikrosatelliten ein. Minisatelliten sind zwar hochpolymorph, aber ohne gleichmäßige Verteilung über das Chromosom (Vergnaud et al., 1991). Erst mit der Entdeckung der Mikrosatelliten waren Marker verfügbar, die allen Anforderungen gerecht wurden. Mit ihrer hohen Variabilität, Co-Dominanz und gleichmäßigen Verteilung auf dem Euchromatin setzten sie sich rasch gegen die bisherigen Marker durch. Mikrosatelliten wurden Marker der Wahl wenn es um Genomkartierung, Kopplungsanalysen, Populationsstudien oder forensische Nachweise geht (Goldstein & Schloetterer, 1999; Pompanon et al., 2005). Nach Entwicklung sogenannter DNA-Chips werden heute mehr und mehr SNPs erfolgreich zur Kartierung eingesetzt.

#### **2.3.5.1 Single Nucleotide Polymorphism**

SNPs sind Polymorphismen an einer einzigen Nukleotidposition. Sie sind biallelisch und werden meist codominant vererbt (Pompanon et al, 2005). Sie eignen sich hervorragend für die Identifikation von Individuen, Schätzungen von Allelfrequenzen oder Kopplungsstudien (Pompanon et al, 2005).

SNPs haben die Fähigkeit den Mikrosatelliten den Rang abzulaufen. Sie kommen in weitaus größerer Anzahl im Genom vor (etwa 1 SNP auf 1.000 bp) (Kwok et al., 1996) und bieten so ein ganzes Markersset nah oder im Locus des Interesses (Landegren et al., 1998). Zusätzlich können in Genen liegende SNPs die Genexpression oder die Genprodukte direkt beeinflussen, was die Suche nach Kandidatengen vereinfachen kann (Landegren et al., 1998).

#### **2.3.5.2 Mikrosatelliten**

Erstmals wurden Mikrosatelliten 1984 von Tautz & Renz beschrieben (Wolz, 1993). Sie entdeckten kurze, hochrepetitive DNA-Sequenzen im Genom nahezu aller Eukaryonten. Bald darauf fand man heraus, dass diese Mikrosatelliten hochpolymorph sind. Die Anzahl der Wiederholungen variiert von Individuum zu Individuum und dieser Polymorphismus lässt sich mit einfachen Mitteln (PCR und Gelelektrophorese) nachweisen (Tautz, 1989; Litt & Luty, 1989; Weber & May, 1989).

Für Mikrosatelliten sind viele Synonyme gebräuchlich (*STR: Short Tandem Repeats, SSR: Simple Sequence Repeats, SSLP: Simple Sequence Length Polymorphism*). Sie bestehen aus tandemartig wiederholten Basensequenzen. Wobei eine einzelne Wiederholungseinheit meist

aus 2-8 bp besteht (Pompanon et al., 2005). Diese Basenabfolge wiederholt sich bis zu 100 Mal nacheinander (Schloetterer & Harr, 2001). Mit dieser Gesamtlänge sind Mikrosatelliten aber noch immer klein genug für die Amplifikation mittels PCR und die Darstellung mit gängigen Gelelektrophoreseverfahren. Minisatelliten hingegen bestehen aus Wiederholungseinheiten von 10-100bp, die sich bis zu 100 Mal wiederholen.

Eine Einteilung der Mikrosatelliten erfolgt basierend auf der Länge ihrer Wiederholungseinheit und ihrer Zusammensetzung. Bezüglich der Länge ihrer Wiederholungseinheit erfolgt eine Klassifikation in Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, Penta-, und Hexanukleotide. Beispiel für einen mononukleotiden Mikrosatelliten wäre die Abfolge (A)<sub>n</sub>, für einen Dinukleotiden entsprechend (AC)<sub>n</sub> usw. Nach Weber (1990) lassen sich Mikrosatelliten anhand ihrer Zusammensetzung einteilen in:

- einfache, perfekte Wiederholungen, bspw. (CA)<sub>n</sub>
- einfache, nicht perfekte Wiederholungen, bspw. (CA)<sub>n</sub>TG(CA)<sub>n</sub>
- zusammengesetzte, perfekte Wiederholungen, bspw. (AC)<sub>n</sub>(GC)<sub>n</sub>
- zusammengesetzte, nicht perfekte Wiederholungen, bspw. (AC)<sub>n</sub>T(GC)<sub>n</sub>

Wobei die einfachen, perfekten Mikrosatelliten etwa 64 % des Gesamtvorkommens aller Mikrosatelliten im Genom ausmachen (Weber, 1990).

Die große Anzahl unterschiedlicher Allele an einem Locus für verschiedene Individuen ist begründet in der unterschiedlichen Anzahl an Wiederholungen der einzelnen Wiederholungseinheiten. Die hohen Mutationsraten der Mikrosatelliten sind die Basis für eine erfolgreiche Anwendung als genetische Marker. Mutationsraten für Mikrosatelliten bei Schweinen werden mit durchschnittlich  $7,52 \times 10^{-5}$  per Locus per Generation angegeben (Yue et al., 2002). *In vitro*-Studien ließen auf noch höhere Mutationsraten schließen, wurden jedoch von *in vivo*-Ergebnissen nach unten korrigiert. Der Grund für die Diskrepanz liegt in der fehlenden Berücksichtigung des Reparatursystems der Zelle bei *in vitro*-Studien. In der Zelle werden Fehlanlagerungen zum Teil erkannt und korrigiert (Schloetterer & Harr, 2001).

Das genaue Mutationsmuster ist noch nicht bekannt. Gleichwohl ist klar, dass der Hauptmechanismus auf einem Fehler der Polymeraseaktivität beruht, dem sogenannten „strand-slippage“ (Schloetterer & Harr, 2001; Yue et al., 2002). Während der Replikation wird der neu synthetisierte Strang um ein oder mehrere Wiederholungseinheiten verschoben angelegt, was in einem Gewinn oder Verlust an Repeat-Einheiten resultiert. Möglich ist dieser

„slippage“ aufgrund der hoch repetitiven Sequenz der Mikrosatelliten. Der neu synthetisierte Strang paßt auch an falscher Stelle (Schloetterer & Haar, 2001).

Mikrosatelliten werden in Kopplung mit Genvarianten in ihrer Nachbarschaft vererbt und eignen sich so den Erbgang der benachbarten Gene zu verfolgen.

Neben einer hohen Variabilität der Marker sind für eine erfolgreiche Kartierung die Abstände der Marker zueinander entscheidend. Während Minisatelliten oft in Clustern an Centro- und Telomer angeordnet sind, erscheinen Mikrosatelliten randomisiert über das Chromosom verteilt (Schloetterer & Haar, 2001). Durchschnittlich liegt im Schweinegenom etwa alle 250.000 bp ein Mikrosatellit (Karlskov-Mortensen et al., 2007; Rohrer et al., 1996). Genauere Analysen zeigen jedoch, dass auch Mikrosatelliten eine Tendenz zur Clusteranordnung haben (Schloetterer & Haar, 2001). Die Verteilung der Mikrosatelliten wird wie die Mutationsrate durch die Länge der Wiederholungseinheit (Mono-, Di-, Tri- etc.), aber auch durch ihre Basensequenz bestimmt.

Tri- und Hexanukleotide findet man gehäuft in den codierenden Bereichen. Dieses Verteilungsmuster findet man nicht nur beim Säuger, sondern ist auch noch über weite taxonomische Bereiche nachzuweisen. Anscheinend hat eine Selektion gegen slippage-Mutationen stattgefunden. Denn hier würde der Verlust oder Zugewinn einer einzigen Wiederholungseinheit den reading-frame zerstören – es sei denn es ist ein Vielfaches von drei (Schloetterer & Haar, 2001). Die meisten Mikrosatelliten liegen im nicht-kodierenden Teil des Chromosoms und ihre Funktion bleibt oftmals unklar. Aber wie oben bereits erwähnt, findet man sie durchaus auch in kodierenden Bereichen oder im Promotorbereich. Man vermutet teilweise auch eine Beteiligung an der Genregulation (Wu et al., 2008).

Beim Schwein beschreibt eine Studie einen Mikrosatelliten-Polymorphismus im Intron des *CART*-Gens (cocaine- and amphetamine-regulated transcript), der in Zusammenhang mit Leistungsmerkmalen steht (Stachowiak et al., 2009).

Eine ganz besondere Rolle spielen die sog. „expanded trinucleotide microsatellites“. Ihre Mutationen umfassen den Gewinn oder Verlust von mehreren Wiederholungseinheiten, wobei Zunahmen deutlich häufiger stattfinden. Solche „expanded trinucleotide repeats“ sind ein Beispiel dafür wie Mikrosatellitenmutationen den Phänotyp beeinflussen können. In der Humanmedizin ist bekannt, dass Träger solcher „expanded microsatellites“ sehr oft an neurodegenerativen Erkrankungen leiden (Schloetterer & Haar, 2001). Diese Mutationen können entweder in der kodierenden Sequenz (Huntington-Krankheit), im Promotor (Fragile

X) oder im nicht-kodierenden Bereich (Myotone Dystrophie) liegen (Schloetterer & Haar, 2001).

### **2.3.5.3 Darstellung von Mikrosatelliten**

Die Darstellung von Mikrosatelliten erfolgt in aller Regel mittels PCR (Mullis & Faloona, 1987) und anschließender Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifikatlänge via Gelelektrophorese.

Hierfür benötigt man zwei den Mikrosatelliten flankierende, im Genom einmalige Primersequenzen. So ist gewährleistet, dass während der Amplifikation aus genomischer DNA nur die Vervielfältigung des Mikrosatelliten erfolgt. Anschließend werden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Da die Amplifikate verschiedener Allele eines Locus sich im Extremfall nur um ein Basenpaar unterscheiden, benötigt man Gele mit hohem Trennvermögen. Hochauflösende, denaturierende Polyacrylamidgele können eine Längenvariation von bis zu 0,2 % (Beispiel: 1 bp bei 500 bp) noch als separate Banden darstellen und eignen sich in besonderem Maße zur Darstellung von Mikrosatelliten (Seyffert, 2003).

Zur genauen Längenmessung der Fragmente wird zu beiden Seiten der Amplifikate ein Längenstandard aufgetragen. Mit Hilfe einer speziellen Software wird so die Fragmentlänge der einzelnen Allele in Bezug zu den Standardgrößen bestimmt. Bei Fragmentlängenanalyse in einem Sequenzierautomaten müssen die Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sein, um die Amplifikate detektieren zu können.

Die Auswertung der Fragmentlängenanalyse bedarf größter Aufmerksamkeit und Sorgfalt im Umgang mit den Proben. Fehler in der PCR, mindere Qualität oder Mutationen der DNA können zu falschen Allelen, Allelic-Drop-Outs, Size-Homoplasy und Null-Allelen führen (Pompanon et al., 2005).

### **2.3.6 Genetische Karte**

Die Lokalisation von QTL setzt eine Markerkarte voraus. Es werden genetische und physikalische Karten unterschieden. Physikalische Karten geben die Markerposition in bp an. Genetische Karten geben die relative Position der Marker zueinander an. Als Maß für Abstände zueinander werden Rekombinationsraten angegeben. Die Rekombinationsrate ist definiert als das Verhältnis der Anzahl der beobachteten Rekombinanten zu Anzahl der

möglichen Rekombinationen (Ott et al., 1991). Anhand der Rekombinationsraten werden die Abstände in cM (Centimorgan) bzw. Morgan (M) berechnet und eine Kopplungskarte erstellt.

Werden zwei Marker unabhängig voneinander vererbt, so sollten alle möglichen Haplotypen mit der gleichen Häufigkeit auftreten. Diese unabhängige Vererbung kommt vor, wenn zwei Loci auf verschiedenen Chromosomen liegen oder auf einem Chromosom weit genug entfernt, um Rekombinationen dazwischen zu erlauben (Wolz, 1993). Tritt aber innerhalb einer Familie ein Marker häufiger mit einem bestimmten anderen Marker auf (Co-Segregation), so nennt man dieses Phänomen Kopplung (Wolz, 1993). Das Ausmaß der Kopplung dient als Messwert für den Abstand zwischen zwei Markern. Als statistische Größe zur Abschätzung einer Kopplung dient der Lod-Score (logarithm of the odds) (Wolz, 1993). In der Regel wird ein Lod-Score  $> 3$  als Kopplung angesprochen. Je näher zwei Marker beieinanderliegen, desto weniger rekombinante Haplotypen entstehen. Betrachtet man Rekombination auf cytologischer Ebene, so bezeichnet man diesen Austausch genetischen Materials als *Crossing-Over*.

Als Einheit für genetischen Abstand dient das Centimorgan (cM). Wobei der Abstand 1cM einer Rekombinationsrate von 1 % entspricht. Die prozentuale Häufigkeit von Crossing-Over-Ereignissen wird also in cM angegeben. Anhand der Rekombinationsraten und Kartierungsfunktionen von Morgan, Haldane oder Kosambi lassen sich Rekombinationsraten in Bezug zu cM setzen. Am häufigsten wird die Funktion von Kosambi verwendet, welche eine Weiterentwicklung der Haldane'schen Gleichung ist.

Allerdings vernachlässigen diese auf Rekombinationshäufigkeiten basierenden genetischen Karten einige Faktoren wie Doppel-Crossing-Over, das häufigere Vorkommen von Crossing-Over in den Telomeren im Vergleich zu Centromeren oder die meist höheren Rekombinationsraten bei weiblichen Tieren (Munk, 2010). Daraus ergibt sich, dass genetische Karten sich zwar gut für die Wiedergabe der Genanordnung eignen, jedoch lässt sich aufgrund der genannten Phänomene nur ein Durchschnitts-Basenpaarwert als physikalischer Abstand ableiten. Beim Schwein umfasst ein Bereich von 20-30 cM in etwa 15-20 Mio. Basenpaare und bis zu 400 Gene (<http://www.animalgenome.org/pig/genome/db/>).

Durchschnittliche Markerabstände von 20 cM werden als ausreichend erachtet, um QTL zu detektieren (Darvasi et al., 1993). Broman (2001) empfiehlt Abstände von 10-15 cM. Bei einer Schweinegenomgröße von etwa 2,3 Morgan bzw. 2,8 Mrd. Basen

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/84>) benötigt man also für eine erfolgreiche genomweite QTL-Kartierung ca. 100 polymorphe Marker.

### 2.3.7 QTL-Kartierung

Nach Erstellung der Kopplungskarte für die verwendete Tierfamilie wird nach Assoziationen zwischen genetischen Markern und quantitativen Merkmalen gesucht. Solche Positionen mit maximaler Kopplung zwischen Leistungsmerkmal und Markerallelen der Founderrassen werden mit der QTL-Analyse errechnet (Haley & Andersson, 1997).

Für die Kartierung von QTL gibt es diverse statistische Verfahren. Am einfachsten gelingt die Berechnung mit Hilfe der „analysis of variance“ (ANOVA oder auch Markerregression genannt) QTL-Analyse (Broman, 2001). Für jeden Marker werden die F<sub>2</sub>-Tiere anhand ihres Genotyps eingeteilt und die Phänotypenverteilung betrachtet. Für den vorliegenden Fall eines F<sub>2</sub>-Familien-Designs wird die Berechnung mittels F-Statistik durchgeführt (Broman, 2001). Dies ist ein statistischer Test, mit dessen Hilfe zwei Stichproben aus verschiedenen, normalverteilten Populationen (hier sortiert nach Markerallel der Ausgangsrassen) nach wesentlichen Unterschieden ihrer Varianz getestet werden. Der größte Vorteil dieser Methode ist ihre Simplizität. Außerdem wird keine genetische Karte benötigt (Broman, 2001). Größter Nachteil ist, dass man nur Informationen für QTL an den Markerpositionen findet. Liegt der QTL in Wahrheit zwischen zwei Markern, ist der scheinbare QTL-Effekt am Marker schwächer als der des wahren QTL-Effektes. Bei großen Markerabständen bedeutet dies auch, dass QTL, die weit entfernt vom nächsten Marker liegen eventuell nicht detektiert werden (Broman, 2001).

Das von Lander & Botstein (1989) entwickelte „interval mapping“ überwindet die Nachteile der ANOVA an Markerloci. Sie verwendet eine genetische Karte und jeder Ort auf dem Chromosom (beispielsweise im cM-Abstand) wird nacheinander als mutmaßliche Position für QTL getestet. Genotypen für Positionen zwischen zwei Markern werden anhand der Genotypen ihrer flankierenden Marker abgeschätzt. Das Abschätzen geschieht unter der Annahme einer Meiose ohne Interferenz. Das statistische Verfahren basiert auf der „likelihood“-Methode. Der likelihood ratio vergleicht die Wahrscheinlichkeit für einen QTL an Position x zu der Hypothese kein QTL an Position x. Der likelihood ratio wird auch „odds“ genannt und als dekadischer Logarithmus geplottet (Logarithm of the odds) (Wolz, 1993). So erhält man eine Kurve mit Lod-Scores auf der y-Achse und cM auf der x-Achse, an deren

höchsten Punkt sich der QTL befindet. Ein zusätzlicher Vorteil des interval-mappings ist, dass auch mit nicht vollständigen Genotypen-Dataset gearbeitet werden kann. Fehlt ein Markergenotyp für ein Individuum wird einfach der nächste verfügbare Marker für die Berechnungen benutzt (Broman, 2001). Ein Nachteil des interval-mappings ist seine Komplexität und der damit einhergehende Rechen- und Zeitaufwand, insbesondere beim Berechnen mehrerer QTL (Broman, 2001; Haley & Knott, 1992).

Haley & Knott (1992) entwickelten eine lineare Regressionsmethode, die wie das interval-mapping auch, flankierende Marker einsetzt. Wie beim interval-mapping unter der Annahme keiner Interferenz. Diese Regression basiert auf der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate ist im Vergleich relativ simpel. Und auch eine Erweiterung zur Berechnung multipler QTL ist einfach möglich. Es konnte gezeigt werden, dass sie sehr ähnliche Ergebnisse liefert wie die auf maximum likelihood basierende Methode von Lander & Botstein (Haley & Knott, 1992). Es wird wieder auf die F-Statistik zurückgegriffen und nach Beziehung zwischen erklärter Merkmalsvarianz (bestehend aus einem Additiven- und Dominanzanteil) und Restvarianz (F-ratio) gesucht. Hohe F-Werte zeugen von einem hohen Anteil an erklärter Varianz an der totalen phänotypischen Varianz des Merkmals (Haley & Knott, 1992). Ideale QTL sind solche Orte auf dem Chromosom bei denen (bezüglich des Merkmals Krankheitsresistenz) alle erkrankten F<sub>2</sub>-Tiere nur Markerallele der empfindlichen Ausgangsrasse zeigen bzw. vice versa. Mit F-Werten auf der y-Achse und cM auf der x-Achse entsteht ein charakteristisches QTL-Profil (Abbildung 6). Der QTL liegt an der Stelle mit dem höchsten F-Wert. Den Bereich, der von der Kurve überspannt wird nennt man Konfidenzintervall. Dies ist eine statistische Größe und gilt als Vertrauensintervall oder Erwartungsbereich. Er gibt den Bereich an, in dem sich mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit der gesuchte Parameter befindet, im vorliegenden Fall der die Merkmalsvarianz auslösende Locus. Dieses nur für Inzuchtlinien anwendbare Modell wurde von Haley et al. (1994) nochmals weiterentwickelt und auf die Anwendbarkeit für Auszuchtlinien erweitert. Zusätzlich wurde die durch simultane Benutzung mehrerer Marker, anstelle von zwei flankierenden, die „detection power“ erhöht.

Seaton et al. (2002; 2006) entwickelten die online Applikationen „QTL Express“ und deren Weiterentwicklung „Grid QTL“, um die von Haley und Kollegen entwickelten Verfahren einer breiten, wissenschaftlichen Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Das web-basierte Modell erlaubt es, fixe Merkmale (bspw. Geschlecht) voreinzustellen und zusätzlich Covariaten, die das Merkmal erklären, mitzuführen. Um die „mapping power“ zu erhöhen ist

es auch möglich bereits identifizierte QTL als Co-Faktoren mitzuführen. Miteingebaut sind Permutationstests (Churchill & Doerge, 1994) um Signifikanzschwellen zu setzen und ein bootstrap-Verfahren zur Abschätzung des Konfidenzintervalls (Visscher et al., 1996).

## **2.4 QTL-Studien bei landwirtschaftlichen Nutztieren**

Die allermeisten Merkmale für die QTL geschätzt wurden, sind polygenen Ursprungs. Mittlerweile sind für alle bedeutsamen Nutztiere eine Vielzahl an QTL kartiert (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>).

Für das Rind sind zurzeit (Stand Dez. 2014) insgesamt 6.305 QTL für 416 Merkmale kartiert. Die meisten für wirtschaftlich interessante Merkmale wie Milchmenge, Milchzusammensetzung und Schlachtkörper (McClure et al., 2010; Rodriguez-Zas et al., 2002; Schrooten et al., 2004), gefolgt von QTL für Reproduktions- und Produktionsmerkmale wie Fruchtbarkeit (Sahana et al., 2010) und Gewichtszunahme (Nkrumah et al., 2007). 549 QTL sind für Gesundheitsmerkmale kartiert, und einige wenige für Exterieurmerkmale und Verhalten.

Nach Schwein und Rind sind für Wirtschaftsgeflügel die meisten QTL beschrieben. Von den 3.442 detektierten QTL fallen allein 2.754 auf Produktionsmerkmale wie Wachstum, Eimenge und -qualität. Große Bedeutung für die QTL-Forschung beim Geflügel hat auch die Suche nach Chromosomenregionen mit Assoziation zur Gesundheit, immerhin 412 QTL sind für diese Merkmalsgruppe beschrieben.

Beim Schaf sind momentan 753 QTL für 212 verschiedene Merkmale notiert. Waren es 2008 nur 40 QTL für 24 Merkmale, und davon die Hälfte der Merkmale für Parasitenresistenz (Berge, 2008), so sind mittlerweile auch beim Schaf die meisten Studien zu den Merkmalen Fleisch und Milch registriert. Aber auch die Forschung in Richtung gesundheitsassoziierter Merkmale schritt weiter voran, 135 QTL sind für Merkmale bezogen auf Gesundheit kartiert, davon wiederum 81 QTL für Parasitenresistenz.

Auch im Aquafarming erwacht Interesse an der Erforschung genetischer Grundlagen von Leistungsmerkmalen. In den letzten Jahren wurde allen voran die Forschung an der Forelle vorangetrieben. Auch beim Lachs sind nun erste Studien veröffentlicht (bspw. Gheyas et al., 2010; Houston et al., 2010; Moen et al., 2009). Für die Regenbogenforelle sind bislang 88 QTL für 12 Merkmale veröffentlicht. Die Mehrzahl QTL (28) wurden für Entwicklungsraten kartiert, gefolgt von QTL für den Umgang mit Stress, Krankheitsresistenz, Wachstum und Reproduktion.

### 2.4.1 QTL-Studien beim Schwein

Für das Schwein sind mit Abstand die meisten QTL in der „Animal QTL Database“ ([www.animalgenome.org/qtldb](http://www.animalgenome.org/qtldb)) verfügbar. Mit 8.315 QTL aus 355 Publikationen für 622 Merkmale führt das Schwein die Liste an. Waren es noch vor wenigen Jahren nur ca. 1.700 QTL für 281 Merkmale, verdeutlicht die heutige Anzahl die immense Bedeutung und Aktualität von QTL für Wirtschaft, Forschung und Wissenschaft. Insgesamt 5.341 QTL sind für die Merkmale Fleisch- und Schlachtkörperqualität kartiert. Dahinter folgen jeweils je 760-780 QTL für die Parameter Reproduktion, Gesundheit, Exterieur/Verhalten und etwas über 650 QTL für Produktionsdaten wie Wachstum oder Futteraufnahme. Viele QTL für Fleisch- und Schlachtkörpermerkmale erklären nur einen geringen Teil der phänotypischen Varianz. Hervorzuheben ist eine QTL-Studie zur Muskulaturzusammensetzung von Wimmers et al. aus 2006, die einen mächtigen QTL auf Chromosom 3 detektieren konnten. Dieser erklärt über 24 % der Varianz.

Die meisten QTL in Bezug auf Fruchtbarkeit sind für die Zitzenanzahl kartiert, wahrscheinlich auch weil dieses Merkmal leicht zu erfassen ist (Buske et al., 2006). Interessant ist ein QTL auf SSC 1. Hier wurde von Wada et al. (2000) ein QTL für Zitzenanzahl in einem Bereich kartiert, in dem sich auch der Östrogenrezeptor-Lokus (Rothschild et al., 1996; van Rens et al., 2002) befindet. So wurden frühere Analysen zu diesem Locus bestätigt. Diese enthüllten den Einfluss dieses Kandidatengens auf die Zitzenanzahl (Short et al., 1997) und deren Bedeutung für die Fruchtbarkeit.

### 2.4.2 QTL-Studien für Krankheitsresistenz

Neben Studien zur allgemeinen Krankheitsempfindlichkeit bzw. -resistenz (Holmberg & Andersson-Eklund., 2004), konnten beim Rind QTL für bedeutende Krankheiten detektiert werden. Darunter 6 QTL für die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (Zhang et al., 2004), über 50 Regionen assoziiert mit Paratuberkulose (Kirkpatrick et al., 2010; Cerschoor et al., 2003), 77 QTL für die Immunantwort bei Maul- und Klauenseuche (Leach et al., 2010) und 5 QTL für Keratokonjunktivitis (Casas et al., 2006; Garcia et al., 2010).

Von großem Interesse für die Milchviehzucht sind die Studien zur Mastitisresistenz und somatischer Zellzahl. Auch hier ist es gelungen zahlreiche QTL zu detektieren (Holmberg & Andersson-Eklund., 2004; Lund et al., 2008).

Auch für das Geflügel wurden QTL in Bezug auf bedeutende Krankheiten erarbeitet. Allen voran seien hier die Studien zur Resistenz gegenüber der Marekscher Krankheit (Heifetz et

al., 2007; Yonash et al., 1999) genannt. Vallejo et al. (1998) waren die ersten, die von QTL bezüglich der Empfindlichkeit für die Mareksche Krankheit berichteten. Sie kartierten 5 QTL, die zusammen für 23 % der phänotypischen Variation verantwortlich sind. QTL assoziiert mit Kokzidienresistenz wurden von Zhu et al. (2003) kartiert und QTL bezüglich Immunreaktivität bei Newcastle Disease (Biscarini et al., 2010; Yonash et al., 2001) und *E. coli* (Yunis et al., 2002) detektiert. Auch für die gerade im Sinne des Verbraucherschutzes ernstzunehmende Salmonellose beim Huhn gibt es kartierte QTL, bspw. für deren Vorkommen in den Ovarien (Calenge et al., 2009) oder auch für die Immunreaktivität (Kaiser et al., 2002; Yunis et al., 2002).

Beim Schaf konzentrieren sich QTL bezüglich Krankheitsresistenz bislang hauptsächlich auf Studien zur Nematodenresistenz (Beh et al., 2006; Crawford et al., 2006; Davies et al., 2006). Allein 81 QTL wurden bislang für Merkmale der Parasitenresistenz erarbeitet. Neben diesem Schwerpunkt sind noch erfolgreiche Studien zu 6 weiteren Krankheitsbildern wie Scrapie (Moreno et al., 2010) oder Salmonellen-induzierter Abort (Lantier et al., 2012) vermerkt, die insgesamt auf 11 detektierte QTL kommen.

Für die Regenbogenforelle sind zur Zeit 1 mächtiger QTL (erklärt bis zu 86 % der phänotypischen Varianz) für die Resistenz gegen die parasitär bedingte „Drehkrankheit“ (Baerwald et al., 2011) und 3 QTL gegen die viral verursachte Pankreasnekrose (Ozaki et al., 2001) bekannt. Auch beim Lachs wurden QTL für die Resistenz gegenüber viraler Pankreasnekrose entdeckt. Der bedeutendste QTL erklärt bis zu über 30 % der phänotypischen Variation und wurde gleich von zwei unabhängigen Forschergruppen erarbeitet (Houston et al., 2008; Moen et al., 2009). Auch wenn dieser QTL bis auf 3 cM (Moen et al., 2009) eingegrenzt werden konnte, bleibt das ursächliche Gen noch immer unklar (Houston et al., 2012). Dennoch wurde der QTL für Zuchtprogramme mittels Marker Assisted Selection ausgewählt und wird kommerziell von Landcatch Natural Selection Ltd., Ormsary, Scotland eingesetzt (Gheyas et al., 2010; Houston et al., 2010; Moen et al., 2009).

Auch an anderen Tierarten als den klassischen landwirtschaftlichen Nutztieren finden QTL-Studien statt. Die Maus dient häufig als Modellorganismus und man hofft, dass einige genetische Determinanten homolog im Menschen zu finden sind (Mc Peek, 2000). Und auch bei unseren Haustieren hält die QTL-Analyse Einzug, so wurden beim belgischen Schäferhund 6 QTL mit dem Merkmal Epilepsie assoziiert (Oberbauer et al., 2010).

#### 2.4.2.1 QTL-Studien für Krankheitsresistenz: Schwein

Verglichen mit der Vielzahl an kartierten QTL für Fleisch- und Schlachtkörperqualität sind QTL-Studien zu Infektionskrankheiten beim Schwein rar (siehe [www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index](http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index)). Dennoch sind inzwischen einige QTL für Krankheitsresistenz und Immunreaktivität bekannt. Edfors-Lilja et al. kartierten 1998 vier genomweit signifikante QTL für die Immunleistung beim Schwein. Weitere QTL bezüglich humoraler Immunantwort wurden von Wimmers et al. (2009) kartiert.

Die ersten QTL für eine Infektionskrankheit wurden 2002 von Reiner et al. anhand des Erregers der Aujeszky'schen Krankheit (*Pseudorabies-Virus*) erarbeitet. Die 3 gefundenen QTL kartieren auf SSC 5, 6 und 9. Spätere Arbeiten zu dieser Erkrankung folgten von asiatischen Wissenschaftlern, die zusätzlich QTL für den Antikörpertiter auf SSC 1, 13 und 14 festmachen konnten (Li et al., 2010; Wang et al., 2012). Die einzige Studie bezüglich einer parasitären Infektionskrankheit wurde ebenfalls von Reiner und Kollegen (2007) durchgeführt. In Bezug auf eine Infektion mit *Sarcocystis miescheriana* gelang es, QTL für Immunglobulinspiegel, Hämatologie, Parasitenanzahl, klinische und klinisch-chemische Merkmale zu erarbeiten. Ein QTL bezüglich der Serum-AST-Werte (Aspartataminotransferase) auf SSC14 wurde in einer nachfolgenden Studie genauer untersucht. Dieser QTL überpannt eine Region, die das für AST codierende Gen enthält. Durch das Auffinden von SNPs gelang es den Effekt des QTL zu erhöhen und das Konfidenzintervall erheblich einzugrenzen (Reiner et al., 2010).

Bezüglich Infektionskrankheiten des Respirationstrakts konnten Studien zu den Erregern *Mycoplasma hyopneumoniae* (Okamura et al., 2012; Uddin et al., 2010), *PRRSV* (Boddicker et al., 2012; Wang et al., 2012; Wimmers et al., 2009) und *App* (Gregersen et al., 2010) erfolgreich QTL detektieren. Im weiteren Sinne sei hier auch die schon erwähnte Studie zur *Pseudorabies*-Empfindlichkeit erwähnt, kann das Virus doch auch eine Rolle im PRDC spielen (Thacker & Thanawongnuwech, 2002).

Uddin et al. (2010) konnten insgesamt 12 QTL für *Mycoplasma*-Antikörpertiter auf den Chromosomen 2, 7, 13, 15, 16 und 18 kartieren. Zusätzlich wurden in derselben Studie auf mehreren Chromosomen QTL für Tetanusantikörpertiter und Interferon- $\gamma$ -Level erarbeitet. Ein besonders interessanter QTL für die Interferon- $\gamma$ -Konzentration liegt auf SSC 5. Er kartiert auf einer Region, wo sich auch das zugrunde liegende Gen befindet (Uddin et al., 2010). Analog zur Studie von Reiner et al. 2010 erscheint hier eine Suche nach

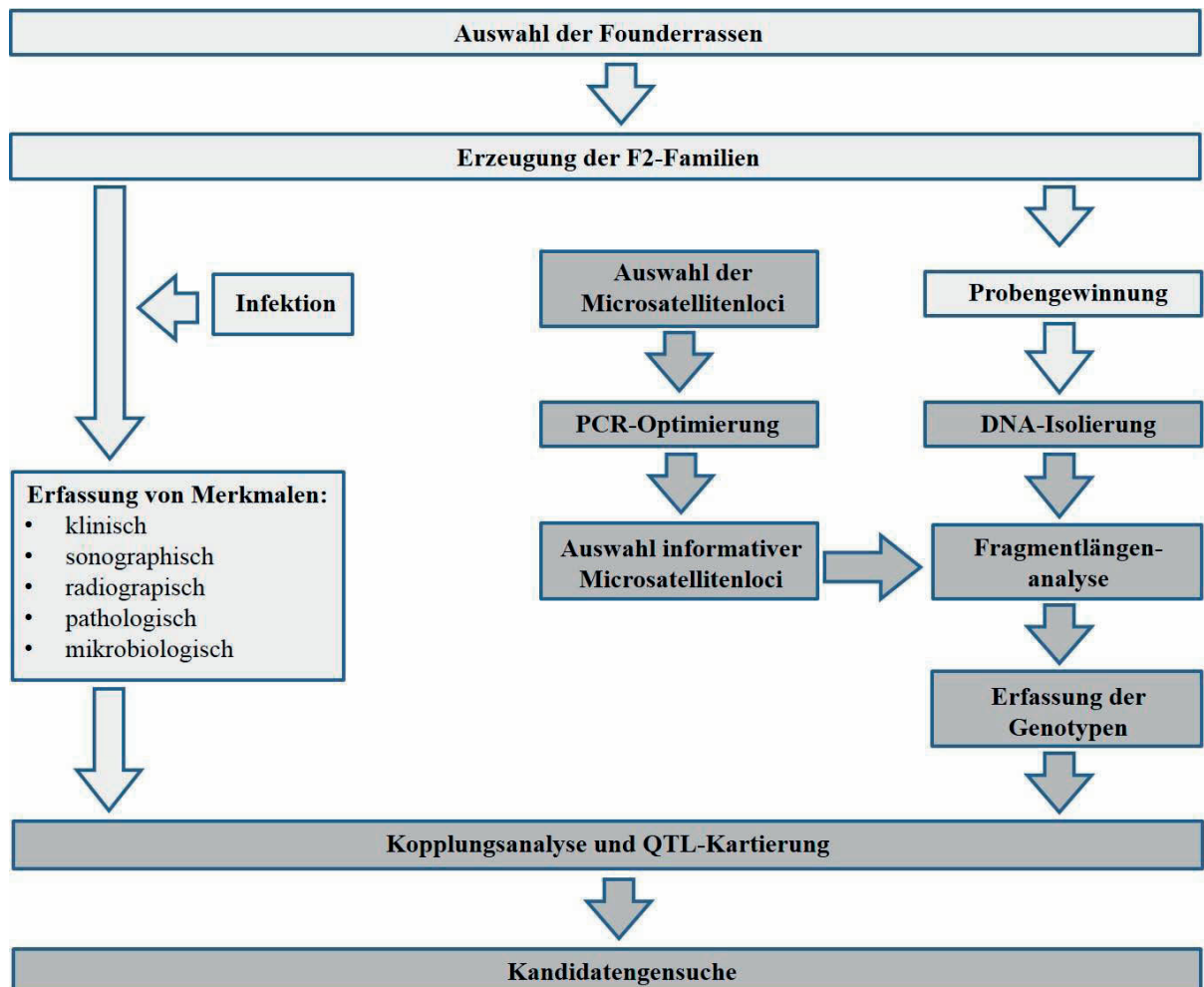
Polymorphismen lohnenswert. Okamura und Kollegen (2012) konnten insgesamt 5 signifikante QTL für Immunkapazität und „respiratory disease traits“ kartieren, wobei ein mächtiger QTL auf SSC 2 mit *Mycoplasma*-Empfindlichkeit assoziiert werden konnte.

Für *PRRSV*-Antikörperlevel sind 3 QTL auf SSC 1, 7 und 13 bekannt (Wang et al., 2012; Wimmers et al., 2009). Wimmers et al. (2009) war es zusätzlich möglich 2 QTL bezüglich des Aujeszky Virus zu kartieren und außerdem noch Cluster von QTL für Komplementaktivität auf dem proximalen Abschnitt von SSC 2, distalen Abschnitt von SSC 4 und zentral auf SSC 16 zu beschreiben.

Anhand der Erfassung pathologischer Befunde an Schlachtkörperlungen, erarbeitete eine dänische Studie QTL assoziiert zur Resistenz gegenüber *App* (Gregersen et al., 2010). Anhand eines Zwei-Generationen-Pedigrees wurden verschiedene Familien aus 12 verschiedenen Duroc-Ebern und über 600 Sauen einer kommerziellen Linie gebildet. Die QTL-Analysen wurden innerhalb der Eberfamilien ausgeführt. Insgesamt wurden 6 QTL auf SSC 2, 8, 12, 13, 14, 18 kartiert, wovon allerdings nur einer (auf SSC 8) auch in mehreren Familien detektiert wurde.

### 3 Material und Methoden

Für diesen Versuch wurde eine informative F<sub>2</sub>-Familie erstellt. Die F<sub>2</sub>-Tiere wurden mit einem *App*-Aerosol infiziert und täglich klinisch untersucht. An Tag 0 und Tag 7 post infectionem (p.i.) erfolgten zusätzlich Untersuchungen mittels Ultrasonographie und Röntgen. Nach Versuchsablauf wurden die Tiere euthanasiert und exakte pathologische und bakteriologische Untersuchungen durchgeführt. Anhand der Mikrosatellitenanalyse wurden die Genotypen der gesamten Tierfamilie bestimmt und anschließend nach Kopplungen zwischen Phänotypvariation und Allelen der Foundertiere gesucht. Der Versuchsablauf wird durch folgende Abbildung verdeutlicht (Abbildung 2):



**Abbildung 2:** Übersicht des Versuchsablaufes. Die hellgrau hinterlegten Boxen und Pfeile zeigen vom Projektpartner TiHo Hannover ausgeführten Arbeitsschritte, die dunkelgrau hinterlegten Boxen und Pfeile zeigen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten Arbeitsschritte.

### 3.1 Versuchstiere

#### 3.1.1 Informative Tierfamilie

Informative F<sub>2</sub>-Familien wurden an der Klinik für kleine Klautiere der Tierärztlichen Hochschule, Stiftung, Hannover, Deutschland erzeugt. Auf Basis einer vorangegangenen Studie (Hoeltig, 2009; Hoeltig et al., 2009) standen für die F<sub>0</sub>-Generation 1 Eber der Rasse Hampshire (relativ resistent) und 2 Sauen der Deutschen Landrasse (relativ empfindlich) zur Verfügung. Im Oktober 2009 wurden 21 F<sub>1</sub>-Tiere in der BHZP Garlitz geboren und im November 2009 in den Versuchsstall nach Hannover überführt. 2 F<sub>1</sub>-Eber (1 je F<sub>0</sub>-Sau) und 9 F<sub>1</sub>-Sauen (4 bzw. 5 je F<sub>0</sub>-Sau) wurden für die Erzeugung der F<sub>2</sub>-Familien verwendet. Insgesamt standen 170 F<sub>2</sub>-Tiere aus 17 Würfen für die Infektionsversuche zur Verfügung (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Erstellung der Tierfamilie.

Generation	Tier Nr. / Identität			Nachkommen
<b>F0</b>	Eber 1 (Hampshire)	Sau 173 (Landrasse)	Sau 366 (Landrasse)	
<b>F1 (gesamt)</b>		5 männliche 6 weibliche	3 männliche 7 weibliche	Σ = 21
<b>Anpaarung F1 für F2</b>				
(F1 Auswahl = 11 Tiere)	Eber F1 04 (Mutter 173)	Sau F1 12		10
	Eber F1 04 (Mutter 173)		Sau F1 11	22
	Eber F1 04 (Mutter 173)		Sau F1 16	22
	Eber F1 04 (Mutter 173)		Sau F1 21	23
	Eber F1 05 (Mutter 366)	Sau F1 07		18
	Eber F1 05 (Mutter 366)	Sau F1 08		16
	Eber F1 05 (Mutter 366)	Sau F1 12		9
	Eber F1 05 (Mutter 366)	Sau F1 15		23
	Eber F1 05 (Mutter 366)	Sau F1 17		19
	Eber F1 05 (Mutter 366)		Sau F1 09	8
				Σ = 170

Alle Versuchstiere waren zu Beginn der Studie klinisch gesund und wurden mittels Apx IIA und Apx IVA ELISA (Leiner et al., 1999; Dreyfuss et al., 2004) auf Abwesenheit von *App*-spezifischen Antikörpern getestet. Die Ergebnisse zusätzlicher Tests auf *Mycoplasma*

*hyopneumoniae* und *PRRSV* mittels Antikörper ELISA (HerdChek, IDEXX laboratories, Wetbrook, Maine, USA) waren negativ. Auch der Hämagglutinationshemmungstest zum Nachweis *Influenza A (H1N1, H1N2, H3N2)*-spezifischer Antikörper war negativ (Hoeltig et al., 2009).

Die Ferkel wurden im Alter von 4 Wochen vom Muttertier abgesetzt und unter standardisierten Bedingungen aufgezogen. Der speziell für dieses Projekt eingerichtete separate Stall war nur durch eine Hygieneschleuse zu betreten. Die Haltung der Tiere und alle nachfolgenden Untersuchungen folgten den Vorgaben des Tierschutzgesetzes (Tierversuchsgenehmigungsnummer 33.9-42502-04-05/919).

### **3.1.2 Infektion der F<sub>2</sub>-Tiere**

Die Infektionsversuche wurden vom Projektpartner der Klinik für kleine Klauentiere der Tierärztlichen Hochschule, Stiftung, Hannover, Deutschland durchgeführt. In vorangegangenen Studien (Baltes et al., 2001, 2003a,b; Tonpitak et al., 2002; Jacobsen et al., 2005; Hennig-Pauka, 2006; Hoeltig et al., 2009) wurde ein erfolgreiches Versuchsmodell entwickelt, welches auch in dieser Forschungsarbeit zur Anwendung kam. Die F<sub>2</sub>-Ferkel wurden im Alter von 7 Wochen in Gruppen von 4-5 Tieren in einer speziellen Aerosolinfektionskammer mit dem Erreger infiziert. Die Infektionsdosis betrug durchschnittlich  $3 \times 10^3$  Kolonie-bildende Einheiten (KbE) pro Liter Aerosol (Hoeltig, 2009; 2013).

Der eingesetzte *App*-Stamm AP76 (Serotyp 7) (Jacobsen et al., 1996; Maas et al., 2006) wurde vom Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover bereitgestellt.

### **3.2 Phänotyp-Datenerhebung und Probengewinnung**

Die Datenerhebung wurde ebenfalls von der Klinik für kleine Klauentiere, Tierärztliche Hochschule, Stiftung, Hannover, Deutschland bewerkstelligt. Für die nachfolgende statistische Auswertung der Phänotyp-Daten wurden die Befunde der Untersuchungen in ein Score-System übersetzt, welches im Rahmen des Vorgängerprojektes Fugato-Iras entwickelt wurde (Hoeltig, 2009). Für nähere Informationen bezüglich der Datenerfassung siehe auch Reiner et al. (2014a,b).

### **3.2.1 Klinische Untersuchung**

Die Versuchstiere wurden vom Tag vor der Infektion (Tag 0) bis Tag 7 post infectionem (p.i.) täglich einer klinischen Untersuchung unterzogen. Diese beinhaltete neben einer exakten Bestimmung des Allgemeinbefindens auch eine genaue Evaluierung des Atmungsapparates, inklusive Sauerstoffsättigung nach Pulsoxymetrie. Es wurden Tages-Scores verteilt, wobei „0“ ohne pathologische Ausprägung und ein Maximalwert „4“ in diesem Falle die höchstgradige Ausprägung beschreiben. Am Versuchsende wurden die einzelnen Tages-Scores zu einem Gesamtwert aufaddiert. Sollte ein Tier vor Versuchsende an der Erkrankung gestorben sein, so wurde auch dies protokolliert und dem Tier für jeden weiteren Versuchstag 5 Punkte zugeordnet. Zusätzlich wurde der Lungenstatus mittels Röntgen- und Sonographieaufnahmen evaluiert. Hierfür wurden die Lungen in verschiedene Sektionen eingeteilt. Diese wurden auf Veränderung des Lungengewebes evaluiert und ergaben gemeinsam den Sonographie- bzw Röntgen-Score. Analog zum Klinischen Score wurden auch hier Punkte nach steigendem Schweregrad vergeben (Hoeltig, 2009, Reiner et al., 2014a,b).

### **3.2.2 Pathologische Untersuchung**

Am Tag 7 p.i. wurden die Tiere euthanasiert und der Sektion zugeführt. Die Lungenläsionen wurden anhand eines von Hannan et al. (1982) entwickelten Beurteilungsschemas (Lung Lesion Score) quantifiziert. Hierfür werden die sieben Lungenlappen schematisch in eine festgelegte Anzahl von Dreiecken aufgeteilt und die Anzahl von Dreiecken pro Lobus gezählt, welche Anzeichen von Gewebeschädigung aufweisen. Jedem Lungenlappen wird so ein Wert zugeordnet der dem Grad der Schädigung widerspiegelt. Die Werte der einzelnen Lobi werden aufaddiert und ergeben den Lungen-Läsions-Score. Leber-, Lungen- und EDTA-Blutproben wurden für die DNA-Extraktion gewonnen (Hoeltig, 2009, Reiner et al., 2014a,b).

### **3.2.3 Respiratory Health Score**

Die Ergebnisse aus klinischer, radiologischer und sonographischer Untersuchung ergaben den Respiratory Health Score (RHS). Der RHS wurde als adäquate Alternative zum Lung Lesion Score von Hannan et al. (1982) entwickelt. Er ermöglicht eine Beurteilung der krankhaften Lungenveränderung am lebenden Tier und zu jedem Zeitpunkt nach Infektion. Eine detaillierte Beschreibung der komplexen Formel zur Berechnung des RHS findet man bei Hoeltig et al. (2009). Basierend auf diesem wurden zwei Tiergruppen mit je 50 Schweinen

mit dem höchsten und niedrigsten RHS gebildet. Der für diese Tiere berechnete Score wurde als RHS\* bezeichnet (Hoeltig, 2009, Reiner et al., 2014a,b).

### 3.2.4 Mikrobiologische Untersuchung

Gewebe wurde von genau definierten Stellen aus jedem der 7 Lungenlobi sowie aus Tonsillen und einem Lungenlymphknoten entnommen und auf Columbia Agar (Jacobsen and Nielsen, 1995) kultiviert. Es wurde ein fraktionierter Ausstrich vorgenommen und das Nährmedium anschließend auf das Wachsen von App-Kolonien hin untersucht. Entsprechend dem Nachweis von App-Kolonien wurden Scores verteilt. Es wurde unterschieden, ob entweder gar keine Bakterienkolonien nachweisbar waren, Bakterienkolonien nur im ersten Ausstrich oder auch in einem der beiden der folgenden fraktionierten Ausstrichen wuchsen. Diese quantitative Auswertung der Platten ergab den Reisolations-Score (Reiner et al., 2014a,b).

## 3.3 *Material für die eigenen Untersuchungen*

### 3.3.1 Geräte und Labormaterialien

DNA-Sequenzierautomat:	LI-COR DNA-Analyser 4200, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA
Thermocycler:	T-Gradient, Whatman Biometra, Göttingen
Photometer:	Ultrospec 1100pro, Amersham Biosciences, Freiburg
Nanodrop 1000:	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermoschüttler:	HLC Biotec, Bovenden
Zentrifugen:	Heraeus Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products, Hanau Micro Zentrifuge SD 220 Vac, Roth, Karlsruhe
Pipetten:	Biohit GmbH, Rosbach v. d. Höhe Roth, Karlsruhe
PCR-Platten:	Biometra, Göttingen
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Roth, Karlsruhe
Waage:	Ohaus Scout II, Ohaus Corp., Pine Brook, N.J., USA
Magnetschüttler:	Vario Monoshake, Roth, Karlsruhe
Kugelmühle:	„MM 300“, Retsch, Haan

Wasserbad:	Memmert WB14, Firma Memmert, Schwabach
Vortexer:	Heidolph Elektro KG
pH-Meter:	Hanna HI 991000, Hanna Instruments, Portugal
Magnetrührer, beheizbar:	Monotherm grau, H+P Labortechnik

### 3.3.2 Chemikalien

Acrylamidlösung	LongRanger Gel Solution, Cambrex Bio Science, Rockland, USA
APS	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
DNA-Isolations Kit	INSTANT Virus RNA Kit, Analytic Jena, Jena
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99,8 %,	Roth, Karlsruhe
Formamid deionisiert	Roth, Karlsruhe
Fuchsin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Micro-90 cleaning solution	Sigma-Aldrich (Waschlotion für Glasplatten)
Primer	Biomers.net GmbH, Ulm Metabion, München
Qiagen Multiplex PCR-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TEMED p.a.	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe

### 3.3.3 Lösungen und Puffer

#### 1x TE-Puffer

10 mM Tris-Lösung

1 mM EDTA-Lösung

#### 10x TBE-Puffer

60,55 g 1000 mM Tris-Lösung

30,9 g 1000 mM Borsäure

3,7 g 20 mM EDTA-Lösung

5N NaOH/1N HCl auf pH 8,3 eingestellt

**Auftragspuffer (Stammlösung; eigene Herstellung)**

12,5 ml Formamid

0,5 ml 0,5M EDTA-Lösung, pH 8,3

6 mg/ml Fuchsin

Stammlösung vor Gebrauch 1/16 verdünnen (14,4 ml Formamid + 600 µl 0,5M EDTA-Lösung, pH 8,3 + 1 ml Stammlösung).

**3.3.4 Computerprogramme und Datenbanken****Datenbanken:**

National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Entrez Gene; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

United States Department of Agriculture; <http://www.usda.gov>

Animal QTL Database; <http://animalgenome.org/qtldb>

Pig QTL Database; <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>

GBrowse; <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/gbrowse/pig/#search>

Gemeinschaftsprojekt von Wellcome Trust Sanger Institut und dem European Bioinformatics Institut (EBI); [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) und [http://www.ensembl.org/Sus\\_scrofa/Location/Genome](http://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Location/Genome)

ArkDB; <http://www.thearkdb.org>

**Computerprogramme:**

OLIGO Primerdesign; Eurofins MWG operon, Ebersberg

GridQTL; [www.gridqtl.org.uk](http://www.gridqtl.org.uk)

IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Version 19.0.0); IBM, Herrenberg

LI-COR e-seq Release 2.0; LI-COR Inc., Lincol, USA

1DScanEx for Windows Version 3.0.1; Scanalytics Inc., Fairfax NA, USA

GeneImagIR Version 4.05 ; Scanalytics Inc., Fairfax NA, USA

### **3.4 Methoden für die eigenen Untersuchungen**

#### **3.4.1 DNA-Extraktion**

Genomische DNA wurde aus EDTA-Vollblut, Leber- oder Milzgewebe mit dem INSTANT Virus RNA Kit von Analytic Jena extrahiert.

##### **3.4.1.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Vollblut**

Die Isolation wurde gemäß der beiliegenden Anleitung durchgeführt. Mit einer kleinen Abänderung zur Erhöhung der DNA-Ausbeute wurde die doppelte Menge Probe und entsprechend die doppelte Menge Lysis Puffer und Binding Solution verwendet.

Als erster Schritt wurden 300 µl Blut und 900 µl Lysis Puffer RL in eine *Extraction Tube* pipettiert und dieses für 15 min bei Raumtemperatur in einem Thermoschüttler inkubiert. Befanden sich Fibrinkonglomerate in der Probe wurden diese mittels Einsatz einer Kugelmühle vor der Inkubation zermahlen (5 mm Stahlkugel; 2 min, 25 Hz). Daraufhin wurde die Hälfte des Inhalts (600 µl) in ein weiteres *Extraction Tube* überführt. Nach kurzem Anzentrifugieren beider Tubes wurden pro *Extraction Tube* 600 µl (insgesamt 1.200 µl) *Binding Solution* RBS hinzugefügt und mittels Vortexer homogenisiert. Danach wurden 650 µl dieser Lösung auf eine Zentrifugationssäule pipettiert und bei 12.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die komplette Lösung über die Säule zentrifugiert war. Die an die Membran der Zentrifugationssäule gebundene DNA wurde noch nacheinander mit je 500 µl *Washing Solution* HS (Zentrifugation 1 min, 12.000 rpm) und LS (Zentrifugation 3 min, 13.000 rpm) gewaschen. Als letzten Schritt wurde die Zentrifugationssäule in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß umgesetzt und 60 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert. Nach 2 min Inkubation wurde die Säule bei 8.000 rpm zentrifugiert und so die gelöste DNA von der Membran in das 1,5 ml-Eppendorfgefäß eluiert.

##### **3.4.1.2 DNA-Extraktion aus Gewebe**

Zur Extraktion von DNA wurden 20-50 mg Gewebe in einem *Extraction Tube* mit 450 µl *Lysis Solution* RL und einer 5 mm Stahlkugel versetzt und in der Kugelmühle gemahlen (2 min, 25 Hz). Im Anschluss wurde die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Thermoschüttler inkubiert und danach zur Abtrennung von Gewebebestandteilen für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues *Extraction Tube* überführt und 450 µl *Binding Solution* RBS hinzugefügt.

Die folgenden Schritte waren analog zu dem beschriebenen Vorgehen bei der DNA-Extraktion aus Blut.

Die extrahierte DNA-Lösung wurde bei -20 °C gelagert. Um Schädigungen der DNA durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren vorzubeugen wurde eine DNA-Gebrauchslösung hergestellt und bei 7 °C im Kühlschrank gelagert.

#### **3.4.1.3 DNA-Konzentrations- und Qualitätsbestimmung**

Die gewonnene DNA wurde photometrisch (Ultrospec 1100 pro, Nanodrop 1000) gemessen. Hierfür wurde die DNA-Stammlösung 1:80 mit 1x TE-Puffer verdünnt und die optische Dichte bei 230, 260, 280 und 320 nm gemessen. Am Nanodrop wurde die Messung ohne vorherige Verdünnung durchgeführt. Für den Einsatz in der PCR wurde die DNA auf eine Konzentration von 20 ng/µl mit 1x TE eingestellt.

Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm zeigt die Reinheit der extrahierten DNA an. Dieser Wert sollte zwischen 1,7 und 2,0 betragen. Werte kleiner 1,7 zeigen Verunreinigungen mit Alkoholen oder Proteinen an, Werte größer 2,0 weisen auf einen erhöhten Gehalt an RNA hin. Ist die optische Dichte bei 320 nm größer Null, weist dies auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen hin.

Alle Proben von minderer Qualität wurden neu extrahiert.

#### **3.4.2 Mikrosatellitenmarker**

Mikrosatellitenmarker und deren zugehörige Primersequenzen wurden von öffentlichen Datenbanken bezogen ([www.usda.gov](http://www.usda.gov); [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), [www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/](http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/)) und so gewählt, dass das ganze Genom möglichst gleichmäßig abgedeckt war. Darunter waren auch Mikrosatelliten, die sich in einer vorangegangenen Studie (Berge, 2008) an einer Piétrain/Meishan-Familie als informativ erwiesen hatten.

Zusätzlich standen 36 Mikrosatellitenmarker zur Verfügung, die im Rahmen des vorangegangenen IRAS Projektes für 35 Kandidatengene entwickelt worden waren.

In vierzehn Fällen (Mikrosatellitenmarker KVL2990, KVL3285, KVL5200, KVL4011, KVL1568, KVL6370, GRP78, KVL140, TCRGMS, KVL838, KVL1782, KVL4016, KVL2451, KVL6085) waren bislang keine Primersequenzen bekannt, die Datenbankeinträge der Mikrosatelliten aber vorhanden. Anhand dieser Informationen wurden die Primer mit Hilfe der Software OLIGO entwickelt.

Sowohl die bereits in der Literatur beschriebenen, als auch die selbst entwickelten Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) oder Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

Die Forward-Primer waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff DY-681 oder DY-781 markiert (siehe Tabelle 13). Alle getesteten Mikrosatellitenmarker sind alphabetisch sortiert mit Sequenz, Farbstoffmarkierung der Primer und PCR-Bedingungen in Tabelle 13 aufgelistet.

Primer, die als Lyophilisat vorlagen, wurden laut Herstellerangaben in 1x TE-Puffer aufgenommen und anschließend die Konzentration bestimmt. Hierfür wurden 5 µl des gelösten Primers mit 395 µl 1x TE-Puffer verdünnt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Ultrospec 1100 pro). Mit Hilfe des Lambert/Beer'schen Gesetzes lässt sich die Konzentration berechnen.

$$E = e \times c \times d$$

E = Extinktion bei 260 nm

e = Extinktionskoeffizient abhängig von der Basenzusammensetzung

c = Konzentration

d = Schichtdicke

Anhand der gemessenen Konzentrationen wurde von allen Primern eine 20 µM Stammlösung angefertigt. Für die Durchführung von Singleplex-PCR-Ansätzen wurden Primermixe aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit einer Konzentration von 1,6 µM (je 0,8 µM) hergestellt. Für die Multiplex-Ansätze wurden die Primerkonzentrationen optimiert und dementsprechend im Primermix angepasst (siehe Tabelle 13, Tabelle 14).

Die Herstellung der verschiedenen Primerlösungen fand in einem separaten PCR-Raum statt, wo sie auch bei -20 °C lichtgeschützt gelagert waren.

### **3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR wurde mit dem Multiplex PCR Kit (Firma Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt. Der PCR-Ansatz mit Primer- und Mastermix erfolgte in einem 0,2 ml PCR-Gefäß in einem separaten PCR-Raum. Beides war während der Handhabung auf Eis gelagert. Die DNA wurde außerhalb des PCR-Raums unter einer Werkbank hinzupipettiert.

Die PCR erfolgte in einem 10 µl-Ansatz und einer Gesamtmenge von 50 ng DNA. Die Primer-Endkonzentration im Singleplex-Ansatz betrug immer 0,2 µM je Primer, im

Multiplex-Ansatz waren sie variabel (siehe Tabelle 13, Tabelle 14). In der nachfolgenden Tabelle sind die eingesetzten Reagenzien für einen 10 µl-Ansatz aufgelistet (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** PCR-Reaktionsansatz für Singleplex- und Multiplex-Ansätze.

Reagenzien	Stamm- Konzentration	eingesetztes Volumen
Mastermix: 2x Multiplex-PCR		5 µl
Primermix (forward & reverse)		
	Singleplex-Ansatz je 0,8µM	2,5 µl
	Multiplex-Ansatz variabel	2,5 µl
DNA	20ng/µl	2,5 µl
		Σ = 10 µl

Die PCR-Bedingungen (Tabelle 6) waren für alle Singleplex-Ansätze gleich, lediglich die Annealingtemperatur und die Zyklenanzahl (Tabelle 13) variierte.

**Tabelle 6:** Bedingungen Singleplex-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang	Zyklenzahl
1	95 °C	15 min	Denaturierung & Aktivierung der Taq-Polymerase	1
2	95 °C	30 sec	Denaturierung	24 bzw. 25
3	variabel	90 sec	Annealing	
4	72 °C	30 sec	Extension	
5	72 °C	10 min	Final Extension	1
6	4 °C	∞	Kühlung	

Für Multiplex-Ansätze wurde das Prinzip der Touchdown-PCR angewendet. Insgesamt wurden drei verschiedene Touchdown-PCR-Programme verwendet (Tabelle 7, Tabelle 13).

**Tabelle 7:** Bedingungen für die Touchdown-PCR (es sind die jeweiligen Annealingtemperaturen der drei Multiplex-Touchdown-PCRs angegeben).

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang	Zyklenzahl
1	95 °C	15 min	Denaturierung & Aktivierung der Taq-Polymerase	1
2	95 °C	30 sec	Denaturierung	8
3	70 ° oder 65 ° oder 63 °C *	90 sec	Annealing	
4	72 °C	30 sec	Extension	
5	95 °C	30 sec	Denaturierung	8
6	68 ° oder 60 ° oder 59 °C *	90 sec	Annealing	
7	72 °C	30 sec	Extension	
8	95 °C	30 sec	Denaturierung	7
9	66 ° oder 55 ° oder 55 °C *	30 sec	Annealing	
10	72 °C	90 sec	Extension	
11	72 °C	10 min	Final Extension	1
12	4 °C	∞	Kühlung	

\* Temperaturbedingung für einen jeweils separaten touchdown-Schritt im PCR-Programm.

Alle PCR-Reaktionen wurden in T-Gradient-Thermocyclern der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) ausgeführt.

### 3.4.3.1 Singleplex-PCR

Die Überprüfung der Mikrosatelliten auf Informativität geschah ausschließlich in Singleplex-Ansätzen. Während dieser Prüfung auf Informativität wurde die Annealingtemperatur zunächst wie vom Hersteller angegeben angewendet. Erwies sich ein Primerpaar als informativ, wurde in einem folgenden Arbeitsschritt die optimale Annealingtemperatur mittels Gradientencycler ermittelt. Hier kann man für jede der 12 Reihen eine unterschiedliche Temperatur einstellen, und so die Optimierung der Annealingtemperaturen in einem Durchgang bewerkstelligen.

Die PCR-Amplifikate wurden zur Prüfung auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden anhand von Bandenstärke und Vorkommen unspezifischer Banden beurteilt. Temperaturen mit höchster Ausbeute an PCR-Produkten bei gleichzeitigem Fehlen oder größtmöglicher Reduktion unspezifischer Amplifikate wurden als optimal angesehen.

### 3.4.3.2 Multiplex-PCR

Informative Primer mit ähnlicher Annealingtemperatur und unterschiedlichen Fragmentlängen wurden zu Multiplex-PCR-Ansätzen zusammengefasst. Analog zur Singleplex-PCR wurde zunächst mit einer Konzentration von 0,2  $\mu$ M je forward- und reverse-Primer im PCR-Ansatz begonnen. Nach Auswertung der Gelelektrophoresebilder wurden die Konzentrationen der Primerpaare bei Bedarf angepasst. Primerpaare, deren Amplifikate sich als starke Banden auf dem Gel abbildeten, wurden in ihrer Konzentration erniedrigt und Primer mit niedriger PCR-Ausbeute wurden in ihrer Konzentration erhöht. So war es möglich die Bandenstärke aller in einer Multiplex-PCR verwendeten Primerpaare anzupassen (Tabelle 13).

### 3.4.3.3 Touchdown-PCR

Zeigten sich bei der Etablierung der Multiplex-PCR unspezifische Banden auf dem Gelbild, so kam die Touchdown-PCR (Tabelle 7) zum Einsatz. Bei dieser PCR-Methode wird in den ersten Zyklen der PCR mit hoher Annealingtemperatur begonnen und diese danach abgesenkt. Da bei hoher Annealingtemperatur nur hochspezifische Bindungen zwischen Primer und Template entstehen, verringert man das Amplifizieren unspezifischer Sequenzen. Diese spezifischen Fragmente werden während der folgenden Zyklen bei niedrigerer Annealingtemperatur weiteramplifiziert und überwiegen bei weitem Amplifikate, die durch unspezifische Bindungen bei niedriger Annealingtemperatur auftreten können.

Der Einsatz der Touchdown-PCR ermöglichte es zusätzlich auch Mikrosatellitenmarker mit leicht unterschiedlichen Annealingtemperaturen in einem Ansatz zu kombinieren.

### 3.4.4 Fragmentlängenanalyse

Die Fragmentlängenanalyse wurde mit dem DNA-Sequenzierautomaten (LI-COR DNA-Analyser 4200) und dem Programm LI-COR e-seq Release 2.0 (LI-COR Inc., Lincol, USA) durchgeführt.

#### 3.4.4.1 Längenstandard

Der Längenstandard wurde selbst hergestellt. Der kürzeste Längenstandard sollte möglichst kürzer als das kleinste Mikrosatellitenamplifikat sein. Gleiches galt für den größten Längenstandard. Für eine genaue Messung wurden noch 3 weitere dazwischenliegende Standards entwickelt. Mit DNA des Plasmidvektors pBluescript II KS+ als Grundlage wurden mittels der Primer MS, MS71, MS141, MS180, MS225, MS281 die entsprechenden DNA-Abschnitte (71 bp, 141 bp, 180 bp, 225 bp, 281 bp) amplifiziert. Primer MS war am 5'-Ende

mit dem Farbstoff DY-781 bzw. DY-681 markiert. Die nachfolgenden Tabellen zeigen den PCR-Ansatz (Tabelle 8) und die PCR-Bedingungen (Tabelle 9) für die Herstellung des Längenstandards.

**Tabelle 8:** Pipettierschema für den PCR-Ansatz (Multiplex-PCR) zur Längenstandardherstellung. Primer MS markiert mit DY-681 oder DY-781.

Reagenz	Primerkombination		Volumen
	forward	reverse	
Mastermix: 2x Multiplex-PCR			12,5 µl
Primermix:	MS	MS71, MS141, MS180, MS225, MS281	10 µl
DNA (10 <sup>6</sup> Moleküle/µl; pBluescript II KS+)			2,5 µl
			Σ = 25 µl

**Tabelle 9:** PCR-Bedingung zur Längenstandardherstellung.

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang	Zyklenzahl
1	95 °C	15 min	Denaturierung & Aktivierung der Taq- Polymerase	1
2	95 °C	30 sec	Deanturierung	30
3	58 °C	90 sec	Annealing	
4	72 °C	90 sec	Extension	
5	72 °C	90 sec	Final Extension	1
6	4 °C	∞	Kühlung	

#### 3.4.4.2 Herstellung des Polyacrylamidgeles

Zur Herstellung eines 6%igen Polyacrylamidgeles wurden zu 8,4 g Harstoff (Fa. Roth), 2,4 ml 10x TBE-Puffer und 2,4 ml Acrylamid (LongRanger Gel Solution, Cambrex Bio Science, Rockland, USA) in ein Becherglas pipettiert. Das Gemisch wurde dann auf 22,5 g mit

destilliertem und deionisiertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden 135 µl APS und 13,5 µl TEMED hinzupipettiert, leicht geschwenkt und die Lösung zwischen zwei Glasplatten (30 cm Länge, Fa. LI-COR) pipettiert. Die Glasplatten waren in dafür vorgesehene Schienen eingespannt und mit zwei Abstandshaltern links und rechts von je 0,25 mm Dicke (Fa. LI-COR) versehen. Während des Pipettierens waren die Glasplatten leicht schräg gestellt, danach wurden die Platten plan hingelegt, das Gel auf evtl. vorhandene Luftblasen kontrolliert und diese gegebenenfalls noch vor der Polymerisation entfernt. Zuletzt wurde eine dritte Klammer im oberen Teil des Geles angelegt, um einen gleichmäßigen Druck über die gesamte Fläche der Glasplatten zu gewährleisten und so eine gleichmäßige Dicke des Geles zu erreichen. Das Gel wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur polymerisiert. Nach der Polymerisation wurde je nach Probenaufkommen ein Haifischkamm mit 48 oder 64 Taschen in das Gel eingesetzt.

#### **3.4.4.3 Probenvorbereitung und -auftrag**

Die PCR-Amplifikate wurden mit Auftragspuffer verdünnt und im Wasserbad bei 96 °C für 3 min denaturiert. Die jeweilige Verdünnungsstufe der Proben wurde mit Auftrag von Amplifikaten der F<sub>0</sub>-Generation etabliert (Tabelle 13).

Bei dem 48er Haifischkamm betrug das Probenauftragsvolumen 0,75 µl, bei dem 64er Kamm 0,25 µl pro Tasche.

Beim Auftrag der Amplifikate der F<sub>0</sub>-Generation wurde nach jeweils 8 Proben ein Längenstandard pipettiert, bei Amplifikaten der 21 F<sub>1</sub>-Tiere nach 10 bzw. 11 und beim Auftrag der F<sub>2</sub>-Tiere wurde maximal alle 24 Proben ein Längenstandard aufgetragen.

#### **3.4.4.4 Gelelektrophorese**

Die Glasplatten mit dem polymerisierten Gel wurden senkrecht in den Sequenzierautomaten eingehängt und ein oberer und unterer Tank mit insgesamt 1.100 ml 1x TBE-Puffer befüllt. Die Elektrophoresebedingungen konnten über die zum Sequenzierautomaten gehörige Software gesteuert und überwacht werden. Zur Vorbereitung des Gels und Überprüfung der Elektrophoresebedingungen wurde ein Vorlauf (Pre-Run) (Tabelle 10) gestartet. Nach Proben- und Längenstandardauftrag folgte dann der eigentliche Lauf (Run) (Tabelle 10). Nach 90 min Laufzeit konnten Fragmentlängen von bis zu 285 bp nachgewiesen werden, nach 120 min wurde die Elektrophorese automatisch beendet.

Die Gele wurden für bis zu vier Läufe wiederverwendet.

**Tabelle 10:** Gelelektrophoresebedingungen.

	Pre-Run	Run
Spannung	1500 V	1500 V
Stromstärke	40 mA	40 mA
Leistung	40 W	40 W
Zeit	15 min	60- max. 120 min
Temperatur	RT*	50 °C

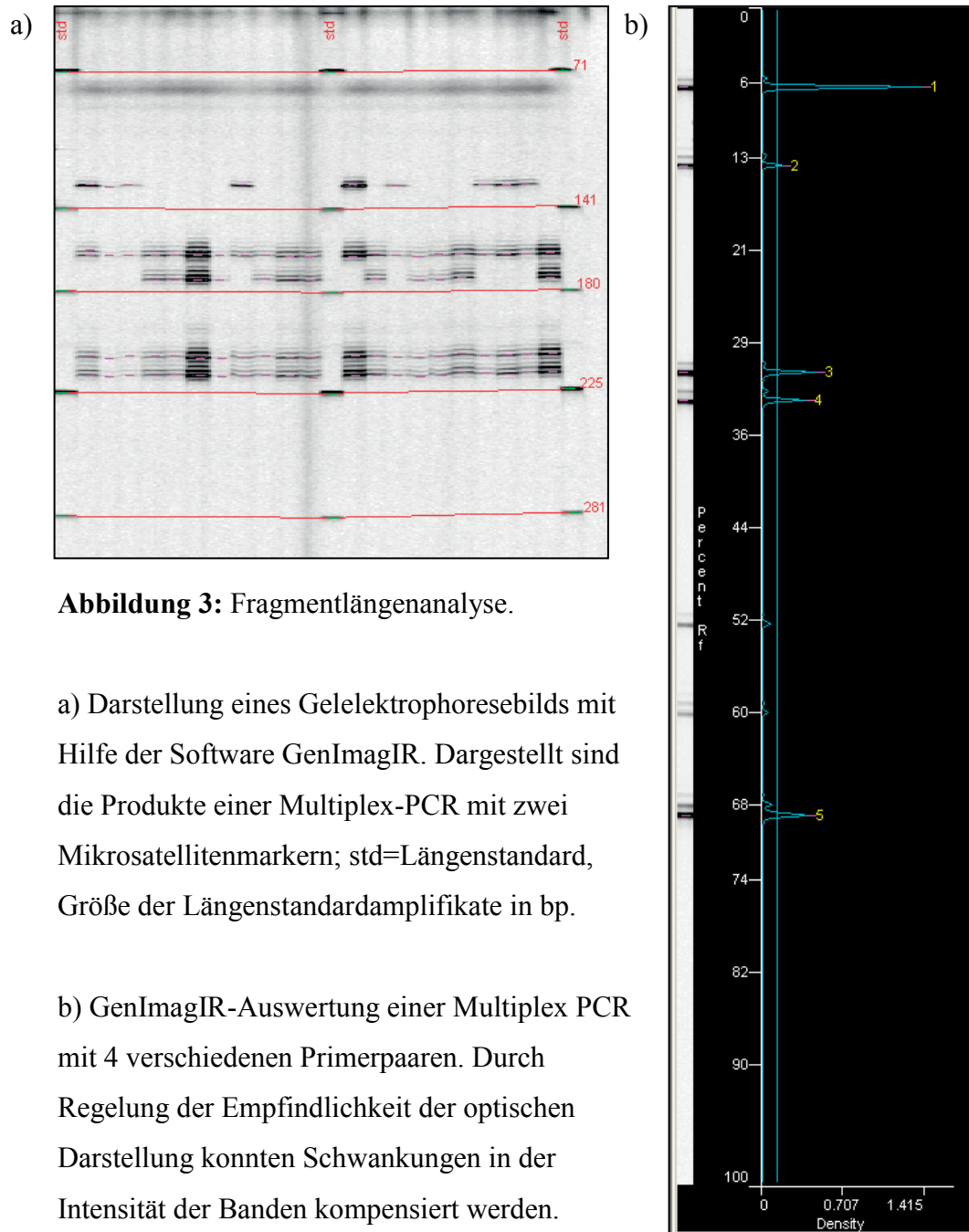
\* Raumtemperatur

#### 3.4.4.5 Auswertung der Fragmentlängen

Die Daten der Gelelektrophorese wurden durch den Sequenzierautomaten an eine mitgelieferte Software (LI-COR e-seq Release 2.0, LI-COR Inc, Lincol, USA) übermittelt und gespeichert. Zur Bearbeitung der Gelbilder wurden die Daten mittels der Programme 1DScanEx for Windows Version 3.0.1 oder GeneImagIR Version 4.05 (beides Scanalytics Inc., Fairfax NA, USA) aufgerufen und in ein lesbares Format konvertiert. Schwankungen in der Intensität der Banden konnte durch Regelung der Empfindlichkeit der optischen Darstellung kompensiert werden.

In dem Übersichtsbild (Abbildung 3) wurden die einzelnen Auftragsspuren markiert und anschließend jede einzeln analysiert. Die einzelnen Banden stellten sich hier je nach Intensität als unterschiedlich hohe Peaks dar. Jeder einzelne Peak wurde auf Plausibilität hin analysiert und die Fragmentlänge auf Basis des Längenstandards berechnet. Beim Auftrag der Amplifikate der F<sub>1</sub>-Tiere wurden die PCR-Amplifikate der F<sub>0</sub>-Generation als Vergleich mit aufgetragen. So konnten die Banden der Nachkommen eindeutig zugeordnet werden, auch wenn sich rechnerisch geringfügig unterschiedliche Fragmentlängen ergaben.

Als informativ wurden Primer mit unterschiedlichen Fragmentlängen für die Founderrassen Deutsche Landrasse und Hampshire definiert.



**Abbildung 3:** Fragmentlängenanalyse.

a) Darstellung eines Gelelektrophoresebilds mit Hilfe der Software GenImagIR. Dargestellt sind die Produkte einer Multiplex-PCR mit zwei Mikrosatellitenmarkern; std=Längenstandard, Größe der Längenstandardamplifikate in bp.

b) GenImagIR-Auswertung einer Multiplex PCR mit 4 verschiedenen Primerpaaren. Durch Regelung der Empfindlichkeit der optischen Darstellung konnten Schwankungen in der Intensität der Banden kompensiert werden.

### 3.4.5 Statistische Auswertung

#### 3.4.5.1 Kopplungskarte

Die genetischen Positionen der Marker CD14, TNF, IFNAR1, CD40, KVL2990, KVL3285, KVL5200, KVL4011, KVL1568 und KVL6370 wurden mit Hilfe der Software CRIMAP Version 2.4 (Green et al., 1990) berechnet. Für alle übrigen Marker wurden die Positionen von NCBI, UniSTS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts>) übernommen. Es wurden Zwei- und Mehrpunktanalysen durchgeführt und ausschließlich geschlechtsneutrale

Kopplungskarten erstellt. Für die Mehrpunktanalysen wurde die BUILD-Option der CRIMAP Software herangezogen.

Die angewandte Lod-Score-Methode schätzt die Rekombinationshäufigkeit ab und bestimmt die Kopplung von (in diesem Falle) Markern in einem Familienstammbaum. Diese Methode vergleicht die Wahrscheinlichkeit den erhobenen Datensatz so zu erhalten, wenn die Loci tatsächlich gekoppelt sind zu der Wahrscheinlichkeit denselben Datensatz rein zufällig zu beobachten. Die Lod-Score-Werte sind demnach ein statistisches Maß für das Vorhandensein einer Kopplung. Werte  $> 3$  wurden als signifikante Kopplung zwischen zwei Markern definiert. Die Software rechnete mit der Kartierungsfunktion von Kosambi die ermittelte Rekombinationsfrequenz in Centimorgan um (Kosambi, 1944).

#### **3.4.5.2 QTL-Kartierung**

Die QTL- Berechnungen erfolgten mit der web-basierten Applikation „Grid QTL“ (Seaton et al., 2006).

Die Analyse basiert auf der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate, welche für Inzucht- und Auszucht-Linien entwickelt wurde (Haley et al., 1994). In das allgemeine lineare Modell wurden die voreingestellten fixen Merkmale Geschlecht und Untersuchungsgruppe einbezogen. Das Infektionsalter wurde als Covariate mitgeführt (Reiner et al., 2014a).

Chromosomenweite und genomweite Signifikanzschwellen wurden durch Permutationstests mit 1000 Permutationen geschätzt (Churchill & Doerge, 1994). Alle mindestens chromosomenweit signifikanten QTL ( $p \leq 0,05$ ) wurden als QTL dargestellt.

Um der Annahme, dass mit mehreren QTL assoziierte Marker-Genotypen unkorreliert sind gerecht zu werden, wurden jeweils mehrere QTL-Berechnungen nacheinander durchgeführt (Holl et al., 2004). Wobei jeweils die größten QTL-Effekte im Modell als Hintergrundeffekt gesetzt wurden.

#### **3.4.5.3 Phänotypen-Assoziations-Analyse**

Die Analyse der Phänotypen erfolgte mit IBM-SPSS, Version 19.0.0 (IBM, Herrenberg). Hier erfolgten Berechnungen zu Effekten von QTL-assozierten Markern auf phänotypische Merkmale. Diese wurden mit einer multiplen Regressionsanalyse getestet, die Mittelwerte mit Anova berechnet. Anstatt die Allel-Längen der Mikrosatellitenmarker zu benutzen, wurden für diese Berechnung die Allele als homozygot von Hampshire stammend (HH), homozygot von Landrasse (LL) stammend oder heterozygot (HL) benannt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *Phänotyp*

Der Phänotyp wurde anhand klinischer, pathologischer, mikrobiologischer, radiographischer und ultrasonographischer Untersuchungen von dem Projektpartner in Hannover bestimmt. Höhere Score-Werte stehen für stärker ausgeprägte Krankheitssymptome. Die Auswertung der Phänotypen zeigte, dass sich der klinische Resistenzunterschied zwischen den beiden Ausgangsrassen in der F<sub>2</sub>-Population aufspaltet. Zusätzlich war festzustellen, dass mit der Dauer der Infektion die Werte für den Klinischen Score anstiegen (Reiner et al., 2014a).

### 4.2 *Genotypen*

#### 4.2.1 Mikrosatellitenanalyse

Insgesamt wurden 487 Mikrosatellitenmarker ausgewählt und in der F<sub>0</sub>-Generation auf Informativität getestet. Davon erwiesen sich 159 als geeignet für die nachfolgende QTL-Analyse. Von den insgesamt 159 Markern waren 142 zu 100 % informativ und 17 zu 75 % informativ, d.h. der Eber und die Sauen der F<sub>0</sub>-Generation haben ein Allel mit identischer Amplifikatgröße (Tabelle 11). Von den 36 Mikrosatellitenmarkern für Kandidatengene aus dem Vorgängerprojekt IRAS wurden in dieser Studie nur 4 als informativ detektiert.

Alle informativen Marker wurden zu 57 Multiplex- und 15 Singleplex-Ansätzen zusammengefasst und in der F<sub>1</sub>- und F<sub>2</sub>-Generation amplifiziert (Tabelle 14). Falls zwei informative Marker an der gleichen Position im Schweinegenom kartierten, so wurde für die nachfolgenden QTL-Berechnungen nur einer von beiden ausgewählt.

Alle 159 Marker, die in die QTL-Berechnungen einbezogen wurden, sind sortiert nach Chromosom und Position mit den detektierten Allelgrößen in der Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11:** Etablierte Mikrosatellitenmarker für die QTL-Berechnungen. Sortiert nach Chromosom (SSC) und Position (cM).

MS	SSC	Position (cM)	Allelgröße (bp) Hampshire (Eber)	Allelgröße (bp) Landrasse (Sauen)	Informativität [%]	Referenz
Sw552	1	9.1	104	104,120	75	Rohrer et al. 1994
Sw1515	1	16.4	122,132	128	100	Alexander et al. 1996b
Sw64	1	23.5	136,140	140,142,156	75	Rohrer et al. 1994
S0316	1	33.4	132,148	120,146	100	Dear & Miller 1994
Sw301	1	55.9	152	116,154	100	Rohrer et al. 1994
Sw2432	1	69.3	180	170	100	Alexander et al. 1996b
Sw1431	1	81	135	129,137	100	Alexander et al. 1996b
Sw745	1	93.9	138	140,200	100	Rohrer et al. 1994
Sw974	1	102.9	102,144	144,166,170	75	Rohrer et al. 1994
S0320	1	112.5	154	162	100	Dear & Miller 1994
Sw2512	1	144	112	108,118	100	Alexander et al. 1996b
Sw2443	2	0	208	204,206	100	Alexander et al. 1996a
Sw2623	2	9.8	116,136	140	100	Alexander et al. 1996a
Sw240	2	42	102,104	90,100	100	Rohrer et al. 1994
Sw834	2	64.3	110,124	98,107,114	100	Alexander et al. 1996b
Sw395	2	66.1	142,160	146,158	100	Rohrer et al. 1994
Sw1517	2	76.9	136	146	100	Alexander et al. 1996b
Swr2157	2	89.2	106,118	108	100	Alexander et al. 1996b
Sw1879	2	102.1	183,185	191,196	100	Alexander et al. 1996b
Swr345	2	114.4	142,146	160,168	100	Rohrer et al. 1994
CD14	2	120,8*	163,168	152,156,168	75	Fugato**
Swr308	2	128.2	145,149	122,157,159	100	Rohrer et al. 1994
S0036	2	132.1	116,128	90,120	100	Brown et al. 1994
APR22	3	0	122,148	146,150	100	Rohrer et al. 1998
Sw2021	3	12.4	106,128	98,110,140	100	Alexander et al. 1996b
Sw72	3	17.8	94	104	100	Rohrer et al. 1994
Sw1443	3	40.1	168	182,188	100	Alexander et al. 1996b
DG50	3	51.5	104	106,116,120	100	Grimm et al. 1997
Swr85	3	64.8	146	140,146	75	Alexander et al. 1996b
S0216	3	86.1	221	215	100	Robic et al. 1995
Sw314	3	90.6	114	104,112	100	Rohrer et al. 1994
KVL1568	3	99,6*	124,138	120,122	100	Karlskov-Mortensen et al. 2007
Sw349	3	112.6	148,170	152,172	100	Rohrer et al. 1994
Sw2532	3	129.3	187,190	176,185,192	100	Alexander et al. 1996b
Sw2404	4	0	126,174	160,162	100	Alexander et al. 1996a
Sw489	4	8	159,169	169,171,173	75	Rohrer et al. 1994
S0301	4	27.1	252	260,262	100	Rohrer et al. 1996
Sw2409	4	40.5	80	82,88	100	Alexander et al. 1996a
Swr1998	4	53.5	168,192	172,178	100	Alexander et al. 1996 b
Sw1073	4	62.3	158,168	158,162	75	Rohrer et al. 1994
S0073	4	74.4	112	90,106	100	Fredholm et al. 1993
Sw58	4	107.9	212,222	206,210,220	100	Rohrer et al. 1994
MP77	4	120	206,234	240	100	Johansson et al. 1992
SE47350	4	131	216	208	100	Rohrer et al. 2002

MS	SSC	Position (cM)	Allelgröße (bp) Hampshire (Eber)	Allelgröße (bp) Landrasse (Sauen)	Informativität [%]	Referenz
Sw413	5	8.4	162,166	164,172	100	Rohrer et al. 1994
Sw1482	5	39.9	98,138	103,135	100	Alexander et al. 1996b
Swr453	5	57.9	186	184	100	Rohrer et al. 1994
Sw2425	5	72.3	94	76,98	100	Alexander et al. 1996a
Sw1071	5	82.9	154	144,146,150	100	Rohrer et al. 1994
Sw963	5	95.5	154,166	164,0	100	Alexander et al. 1996b
Sw152	5	107	164	170,174	100	Rohrer et al. 1994
Sw1954	5	130.3	190	194	100	Alexander et al. 1996b
S0035	6	7.3	178,182	174,176	100	Brown & Archibald 1995
KVL3285	6	30.2*	128	120,212	100	Karlskov-Mortensen et al. 2007
Sw1057	6	47.1	182,184	154,164	100	Rohrer et al. 1994
MN42	6	61	152	150,154	100	Zhao et al. 1999
DG81	6	68	241	238,243,245	100	Grimm et al. 1997
Sw1376	6	76.5	110,122	108,114,124	100	Alexander et al. 1996b
Swc4	6	82.1	162	158,168	100	Alexander et al. 1996b
DG79	6	105.5	234	244	100	Grimm et al. 1997
S0121	6	116	164,178	172,174	100	Robic et al. 1994
DG93	6	122.5	142	156,160,166	100	Grimm et al. 1997
Sw1680	6	153.9	140	132,144,146	100	Alexander et al. 1996b
Sw2052	6	164.6	144,152	134,146,150	100	Alexander et al. 1996b
S0025	7	3.7	110	97,103,106	100	Coppieters et al. 1993
Sw1354	7	22.3	98,116	98,118	75	Smith et al. 1995
S0064	7	30.2	88,94	104	100	Fredholm et al. 1993
Swr1078	7	32.9	164	134,172,174	100	Smith et al. 1995
Sw1369	7	48.2	141,143	133	100	Smith et al. 1995
TNF	7	55.8*	174,186	174,178	75	Fugato**
Sw2019	7	60.5	140	126,138	100	Alexander et al. 1996b
Sw1701	7	73.4	134	124,126	100	Smith et al. 1995
S0334	7	85.2	158	168,178,188	100	Groenen et al. 1995
KVL4011	7	95.9*	144	142	100	Karlskov-Mortensen et al. 2007
Sw1083	7	109.5	110,114	112	100	Rohrer et al. 1994
S0101	7	134.9	195,210	210,212	75	Ellegren et al. 1994
S0212	7	141.2	230,233	228,235,238	100	Robic et al. 1994
Sw1380	7	156.6	172,176	156,170,172,174	75	Smith et al. 1995
SY19	8	2.4	275	270,283,285	100	Campbell et al. 2003
S0098	8	12.4	96,102	98,100	100	Ruyter et al. 1994
Sw1345	8	25.2	156	176,194	100	Alexander et al. 1996
Swr1101	8	38.3	142,166	134,160,162	100	Rohrer et al. 1994
Y205-2	8	47.9	104	102,106	100	Guo et al. 2004
Sw1953	8	58.2	170	150,152	100	Alexander et al. 1996b
DG33	8	70	170	160,172	100	Grimm et al. 1997
KS110	8	82.8	264	268	100	Wang et al. 2000a
Sw790	8	107.5	112	136	100	Rohrer et al. 1994
KS150	8	112.3	96,100	82,104	100	Wang et al. 2000b
Sw1980	8	126.1	187	178,195,198	100	Alexander et al. 1996b
Sw911	9	36.8	164	154	100	Rohrer et al. 1994
ESTMS20	9	52.5	106,130	126,130,136	75	Rohrer et al. 2002
Sw2074	9	65.4	150	156,158	100	Alexander et al. 1996b

MS	SSC	Position (cM)	Allelgröße (bp) Hampshire (Eber)	Allelgröße (bp) Landrasse (Sauen)	Informativität [%]	Referenz
Sw1491	9	76.5	144	112	100	Alexander et al. 1996b
Sw2093	9	103.6	98	96,118	100	Alexander et al. 1996b
Sw2116	9	130.1	127	122	100	Alexander et al. 1996b
Sw830	10	0	180	178,184	100	Rohrer et al. 1994
KVL2990	10	9,1*	172,174	168	100	Karlskov-Mortensen et al. 2007
Sw497	10	39.3	88,98	94,104	100	Rohrer et al. 1994
S0070	10	62.3	278	276,290	100	Fredholm et al. 1993
Sw2043	10	87.7	136,138	140	100	Alexander et al. 1996b
Sw1708	10	101	98,106	114,118	100	Alexander et al. 1996b
Sw1626	10	108	142,146	130,132,150	100	Alexander et al. 1996b
S0385	11	0	173	146,169	100	Riquet et al. 1995
S0391	11	5	170,188	182,192,194	100	Riquet et al. 1995
Sw1460	11	9	80,112	104,106,110	100	Alexander et al. 1996b
SJ001	11	14.1	154,164	140,142,156	100	Mikawa et al. 1999
S0533	11	37	221	235,240	100	Petiot & Anderson Dear, 1997
Sw13	11	80.5	157	152	100	Rohrer et al. 1994
S0143	12	6.6	154,158	164	100	Wilke et al. 1994
S0229	12	19.3	150	140	100	Robic et al. 1994
Sw2559	12	64.7	142	144	100	Alexander et al. 1996b
Sw1956	12	82	175	177,180,182	100	Alexander et al. 1996b
Sw467	12	88.5	118	108	100	Rohrer et al. 1994
SE259162	12	103	118	114,121	100	Rohrer et al. 2002
Swr1021	12	113.1	87	91	100	Rohrer et al. 1994
S0282	13	0	124,128	126,134,136	100	Davies et al. 1994
Sw1378	13	19.1	85,90	85,95	75	Alexander et al. 1996b
Sw344	13	35.4	174	158,176,180	100	Rohrer et al. 1994
Sw882	13	53	124,130	109	100	Rohrer et al. 1994
Sw1979	13	61.7	166	176	100	Alexander et al. 1996b
Sw129	13	71.7	98,128	116,118,126	100	Rohrer et al. 1994
Sw1056	13	96.1	144	156,166	100	Alexander et al. 1996b
IFNAR1	13	99,9*	165,174	153,178	100	Fugato**
Sw2440	13	102.2	141	135	100	Alexander et al., 1996a
Sw1631	14	8.6	98,104	86,104	75	Alexander et al. 1996b
Sw2038	14	19.3	126	106,118	100	Alexander et al. 1996b
Sw1414	14	32	170,196	186,192	100	Alexander et al. 1996b
Sw288	14	44.6	130	106,120,134	100	Rohrer et al. 1994
Sw63	14	54.2	148,160	158	100	Rohrer et al. 1994
Sw886	14	63.3	148,172	152,166	100	Rohrer et al. 1994
Sw1081	14	72.1	152,155	136	100	Rohrer et al. 1994
Swc27	14	111.5	136	136,160	75	Alexander et al. 1996a
KS119	15	15	172	164,174	100	Wang et al. 2000a
Sw1562	15	29.5	160,168	170	100	Alexander et al. 1996b
KS111	15	41	222	188,203	100	Wang et al. 2000a
S0369	15	56	160	164	100	Robic et al. 1997
SY1	15	70.5	124,138	134,144	100	Sonstegard et al. 1998
KS154	15	81.1	164	158	100	Wang et al. 2000b

MS	SSC	Position (cM)	Allelgröße (bp) Hampshire (Eber)	Allelgröße (bp) Landrasse (Sauen)	Informativität [%]	Referenz
KS156	15	90	179	177	100	Wang et al. 2000b
Sw1983	15	101.5	184	154,164,192,194	100	Alexander et al. 1996b
KVL5200	15	109,7*	82	78,92	100	Karlskov-Mortensen et al. 2007
Swr312	15	119.9	122,140	120,140	75	Rohrer et al. 1994
Sw742	16	9.3	207,222	202	100	Rohrer et al. 1994
Sw2411	16	16.7	194,196	200	100	Alexander et al. 1996b
S0298	16	33.2	170	173	100	Rohrer et al. 1996
S0026	16	46.9	94	92	100	Coppieters et al. 1993
Swr2480	16	55.7	230,240	225	100	Alexander et al. 1996b
Sw18	16	93.2	88	94	100	Alexander et al. 1996b
Swn335	17	0	88	80,92	100	Rohrer et al. 1997
Swr1004	17	17.8	154,156	156,160	75	Rohrer et al. 1994
Sw2441	17	40.6	164	160	100	Alexander et al. 1996a
Sw1920	17	56.4	116	85,123	100	Alexander et al. 1996b
S0359	17	65	263	266,276,279	100	Robic et al., 1997
CD40	17	67*	168	174	100	Fugato**
S0332	17	86	147	106,145	100	Groenen et al. 1995
Sw2431	17	91	160	157,164,166	100	Alexander et al. 1996a
SY4	18	-4.4	146	142,150	100	Campbell et al. 2001
SW1984	18	29.4	136,147	142,157	100	Alexander et al. 1996b
Swr414	18	57.6	170,196	186,191	100	Alexander et al. 1996b

\*relative Positionen von Markern wurden mit CRIMAP (Green et al., 1990) ermittelt. Alle anderen Markerdaten wurden aus der öffentlichen Datenbank (NCBI, UniSTS) bezogen. \*\* im Rahmen dieser Studie mit vorangehendem Verbundprojekt Fugato IRAS zusammen entwickelte Marker.

### 4.2.2 Kopplungskarte der informativen Marker

Für Marker mit bislang unbekannter Position wurde anhand eigener Ergebnisse die Lage auf dem Chromosom bestimmt. Die daraus resultierenden Positionen aller für die QTL-Analyse berücksichtigten Marker sind in Tabelle 11 dargestellt. In Abbildung 4 und Abbildung 5 sind die Positionen der etablierten Marker inklusive der kartierten QTL abgebildet.

Da keine Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Resistenz/Empfindlichkeit vorlagen, wurde auf die Erstellung einer Kopplungskarte für das X-Chromosom verzichtet.

## 4.3 QTL-Kartierung

### 4.3.1 Übersicht

Die QTL-Analyse lieferte für die 15 unterschiedlichen phänotypischen Merkmale insgesamt 17 chromosomweit ( $p \leq 0,05$ :  $n=13$ ,  $p \leq 0,01$ :  $n=4$ ) und 5 genomweit signifikante ( $p \leq 0,05$ ) QTL. Bedeutsame QTL konnten auf den Chromosomen 2, 6, 12, 13, 16, 17 und 18 kartiert werden. QTL für 10 Merkmale, darunter RHS, das Auftreten von Todesfällen, Klinischer Score Tage 1-7 p.i. und Radiologischer Score, wurden auf SSC 2 bei 114 cM kartiert (Abb. 4 und 5) (Tabelle 12).

QTL auf Chromosom 2, 6, 12 und 17 hatten ihren Peak im Bereich der Marker Swr345 (SSC 2), KVL3285 (SSC 6), S0143 (SSC 12) und SWN335 (SSC 17).

Die F-Werte für genomweite Signifikanzschwellen lagen bei 9,8 ( $p \leq 0,05$ ). Für chromosomweite Signifikanz wurde die F-Wert-Schwelle auf 7,7 ( $p \leq 0,01$ ) bzw. 5,4 ( $p \leq 0,01$ ) geschätzt (Tabelle 12).

Bis zu 22,16 % der phänotypischen Gesamtvarianz konnten durch chromosomweit signifikante Einzel-QTL erklärt werden. Die genomweit signifikanten erklärten zwischen 8,65 und 9,18 % der Varianz in der F<sub>2</sub>-Generation (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Statistische Ergebnisse der QTL-Analyse. Die QTL sind in ihrer Reihenfolge sortiert nach Merkmal und Sequenz (Seq) wie sie in die QTL-Analyse einbezogen wurden.

Merkmal	Seq	SSC	cM <sup>1</sup>	CI <sub>95</sub>	F-Wert	p-Wert <sup>2</sup>	% <sup>3</sup>	A <sup>4</sup>	±SD	D <sup>5</sup>	±SD
Klinischer Sc. 1 T.p.i.	1	2	114	10-131	6,59	*	13,29	0,33	0,1	-0,1	0,13
Klinischer Sc. 2 T.p.i.	1	2	114	25-118.5	8,67	**	10,34	0,72	0,19	-0,32	0,26
Klinischer Sc. 3 T.p.i.	1	2	114	26.5-115	9,18	**	9,77	1,12	0,29	-0,52	0,4
Klinischer Sc. 4 T.p.i.	1	2	114	35.5-115.5	9,92	***	9,18	1,57	0,39	-0,79	0,54
Klinischer Sc. 5 T.p.i.	1	2	114	38-114	9,98	***	9,11	2,01	0,5	-1,04	0,69
Klinischer Sc. 6 T.p.i.	1	2	114	63-119	10,4	***	8,8	2,46	0,6	-1,33	0,84
Klinischer Sc. 7 T.p.i.	1	2	114	100-114	10,82	***	8,14	2,94	0,71	-1,65	0,98
	2	17	7	3-90	6,63	*	12,89	0,41	0,78	4,25	1,91
Sonographischer Sc. 0 T.p.i.	1	12	20	8-106	6,32	*	14,18	0,11	0,05	-0,26	0,09
Sonographischer Sc. 7 T.p.i.	1	6	30	13.5-109	7,23	*	12,48	1,71	5,73	37,12	9,8
	2	12	2	0-93.5	5,4	*	16,35	-15,16	7,28	-15,29	11,82
Radiographischer Sc. 7 T.p.i.	1	2	114	31-115	7,81	**	11,56	4,34	1,3	-3,25	1,81
Todesfälle (ja/nein)	1	2	114	0-124	5,48	*	16,21	0,07	0,02	-0,44	0,03
Lungen Läsions Sc.	1	18	0	0-58	6,2	*	22,16	0,18	0,99	5,23	1,49
Reisolations Sc.	1	16	24	0-84	6,71	*	13,36	-0,69	0,83	-4,17	1,15
	2	18	6	0-55	5,99	*	8,86	4,34	1,3	-3,25	1,81
RHS	1	2	114	83-114	10,44	***	8,65	5,69	1,41	-3,21	1,95
	2	6	28	14-109	6,49	*	13,62	0,79	1,59	9,45	2,63
	3	17	7	4-91	6,53	*	13,41	1,73	1,56	7,88	2,39
	4	12	1	0-106	5,45	*	15,68	-3,14	1,78	-4,49	2,63
RHS*	1	18	4	0-58	8,2	**	6,44	0,12	0,07	0,42	0,13
	2	13	56	0-128	7,2	*	7,07	-0,99	0,1	0,2	0,13

Sc., Score; T.p.i., Tage post infectionem; RHS, Respiratory Health Score; RHS\* zwei Gruppen von Schweinen mit den 50 höchsten und niedrigsten Respiratory Health Scores; CI<sub>95</sub> 95 % Konfidenz-Intervall.

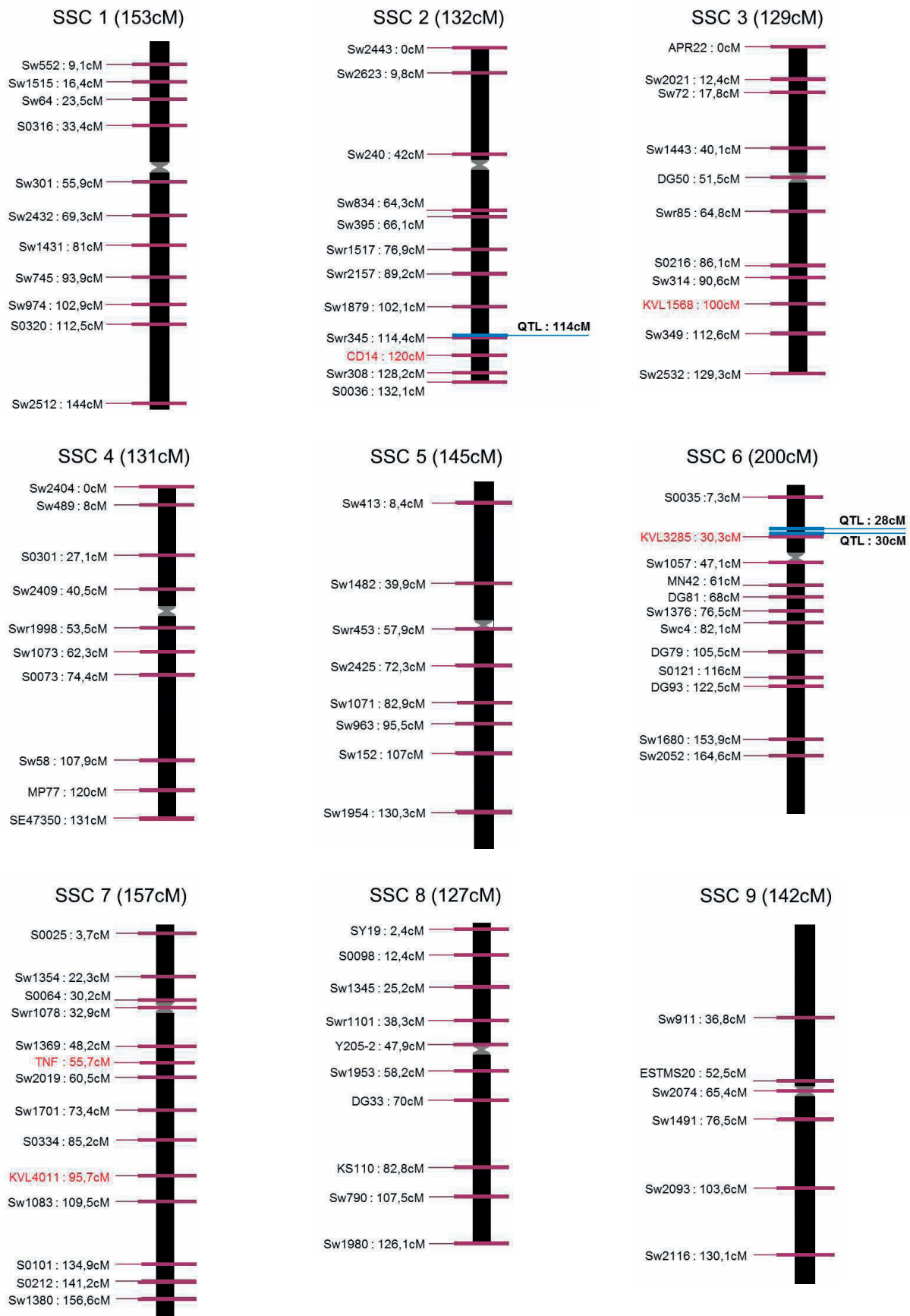
<sup>1</sup> Position auf dem Chromosom in Centimorgan (cM).

<sup>2</sup> Signifikanz des QTL: \* signifikant auf chromosomenweitem Level mit  $p \leq 0,05$ ; \*\* signifikant auf chromosomenweitem Level mit  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*signifikant auf genomweitem Level mit  $p \leq 0,05$

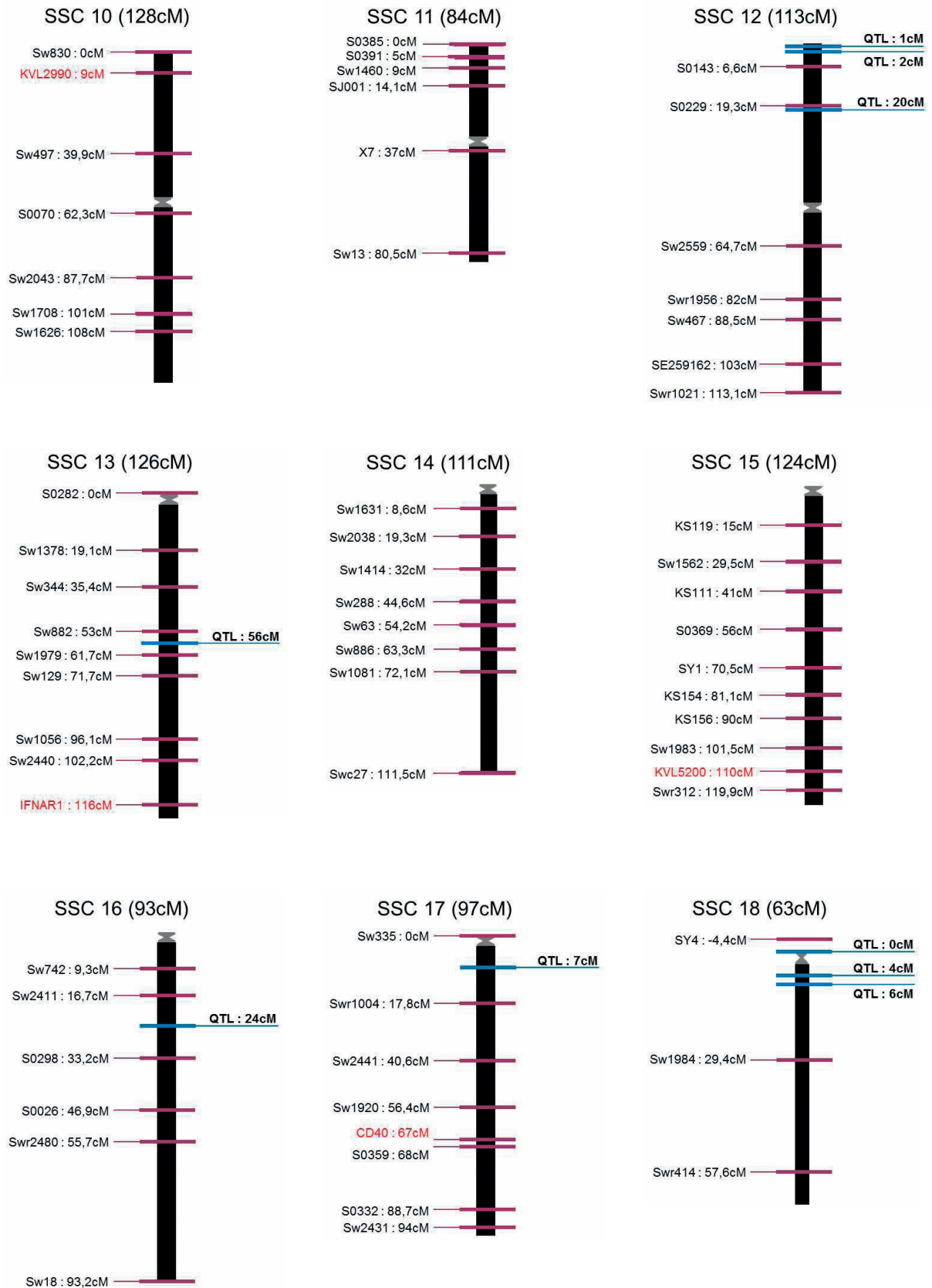
<sup>3</sup> Prozent der durch den QTL erklärten phänotypischen Varianz.

<sup>4</sup> Additive Effekte des QTL ± Standardabweichung (SD); positive Werte indizieren dass die Hampshire-Allele höhere Werte für das Merkmal aufweisen als die Landrassen-Allele und umgekehrt.

<sup>5</sup> Dominanzeffekte des QTL ± Standardabweichung



**Abbildung 4:** Positionen aller informativen Mikrosatellitenmarker und kartierte QTL auf SSC 1 bis SSC 9. Relative Positionen von Markern in roter Schrift wurden mit CRIMAP (Green et al., 1990) ermittelt. Alle anderen Markerpositionen wurden aus der öffentlichen Datenbank (NCBI, UniSTS) bezogen. Die Gesamtlänge des jeweiligen Chromosoms ist oberhalb in Klammern angegeben.

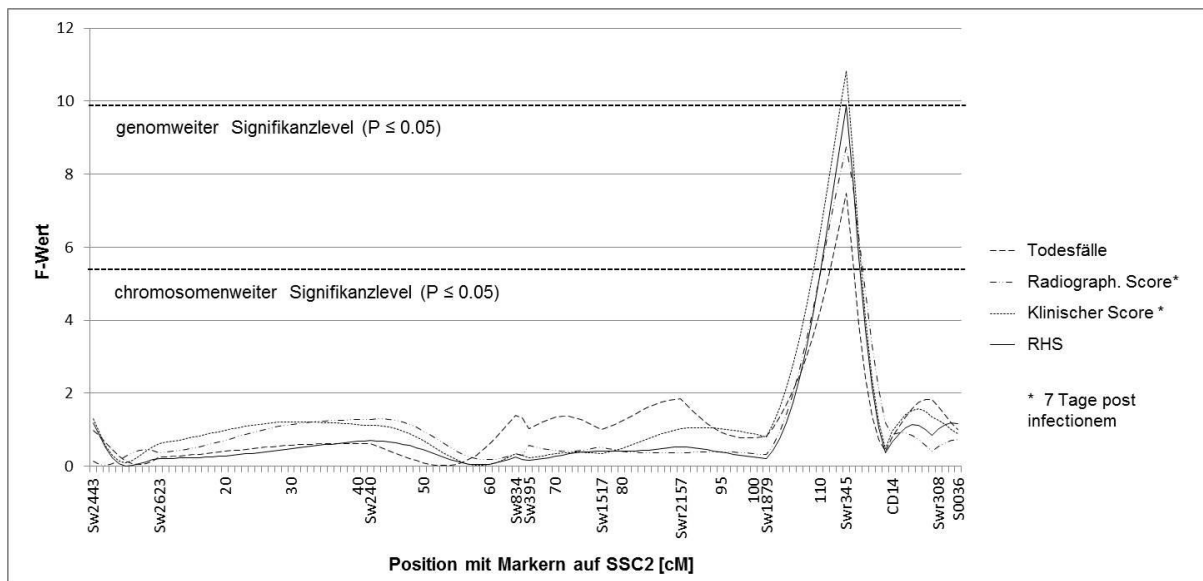


**Abbildung 5:** Positionen aller informativen Mikrosatellitenmarker und kartierte QTL auf SSC 10 bis SSC 18. Relative Positionen von Markern in roter Schrift wurden mit CRIMAP (Green et al., 1990) ermittelt. Alle anderen Markerpositionen wurden aus der öffentlichen Datenbank (NCBI, UniSTS) bezogen. Die Gesamtlänge des jeweiligen Chromosoms ist oberhalb in Klammern angegeben.

### 4.3.2 QTL für den Klinischen Score

Insgesamt konnten 8 QTL für den klinischen Verlauf nach der Infektion kartiert werden. Sieben hatten ihren Peak auf Chromosom 2 bei 114 cM. Diese QTL zeigten steigende F-Werte und engere Konfidenzintervalle mit fortlaufender Infektion mit dem größten F-Wert für 7 T.p.i. (Abbildung 6). Für die Tage 4-7 p.i. erreichten die QTL ein genomweites Signifikanzniveau.

Zusätzlich wurde der Klinische Score von einem QTL auf Chromosom 17 beeinflusst, dieser zeigte sich erst an Tag 7 nach der Infektion.



**Abbildung 6:** QTL auf SSC 2. Es konnten ausgeprägte QTL für die Merkmale Todesfälle, Radiographischer Score, Klinischer Score und Respiratory Health Score auf Position des Markers Swr345 kartiert werden.

### 4.3.3 QTL für Respiratory Health Score

Der Respiratory Health Score wurde von 4 QTL auf den Chromosomen 2, 6, 12 und 17 beeinflusst. Der QTL auf Chromosom 2 bei 114 cM erreichte ein genomweites Signifikanzniveau (Abbildung 6). Die restlichen 3 QTL waren chromosomweit signifikant.

### 4.3.4 QTL für bildgebende Verfahren

Für den Röntgen-Score konnte ein chromosomenweit signifikanter QTL auf Chromosom 2 kartiert werden (Abbildung 6).

Für den Sonographie-Score wurde ein QTL für Tag 0 auf Chromosom 12 und zwei QTL für Tag 7 p.i. auf SSC 6 und 12 berechnet. Die QTL erreichten die chromosomenweite Signifikanzschwelle.

#### **4.3.5 QTL für Todesfälle, Sektions- und Re-Isolations-Score**

Für plötzliche Todesfälle, die während des Infektionsversuches auftraten wurde ein QTL mit chromosomweiter Signifikanz auf SSC 2 wiederum bei 114 cM kartiert (Abbildung 6).

Einfluss auf das Sektionsbild hatte ein QTL auf Chromosom 18 der chromosomenweites Signifikanzniveau erreichte.

Das quantitative Merkmal der Re-Isolation von zur Infektion eingesetzten Erregern zeigte Assoziationen zu zwei chromosomenweit signifikanten QTL auf SSC 16 und 18.

#### **4.3.6 QTL für RHS\***

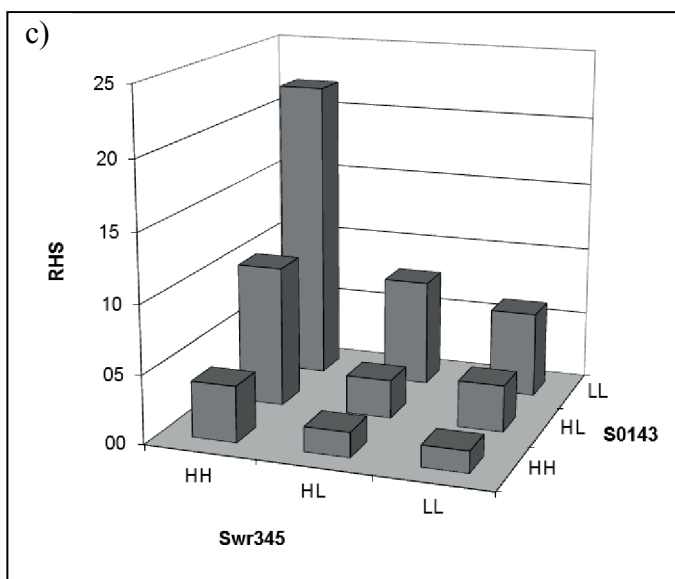
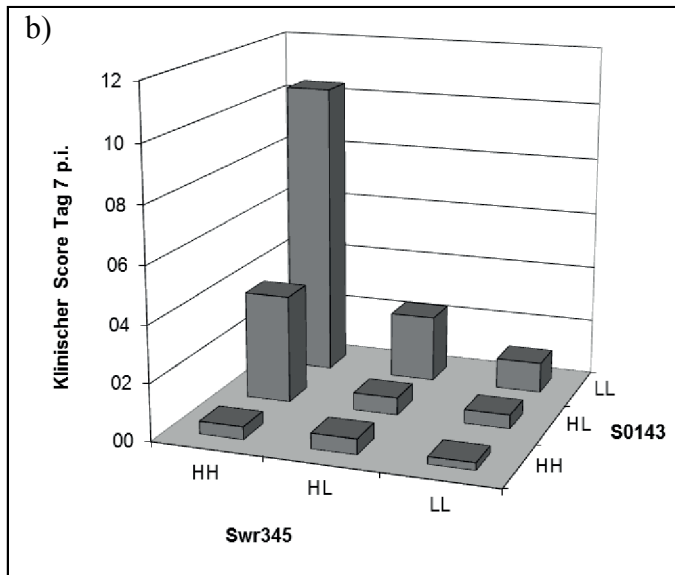
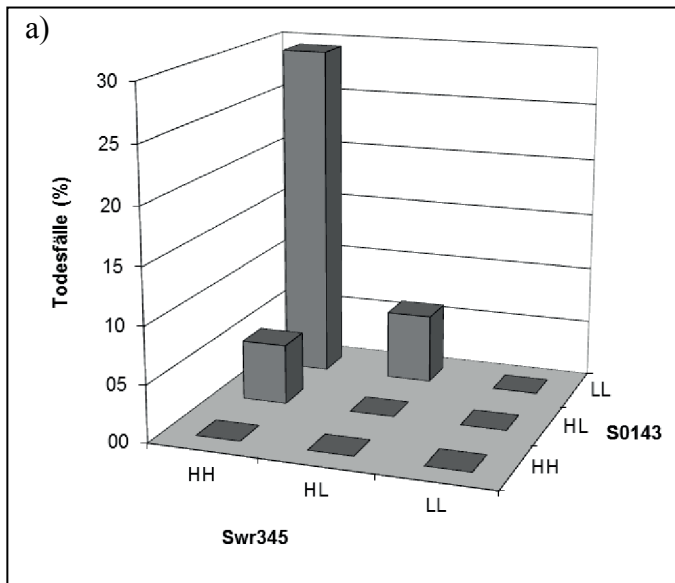
QTL-Berechnungen für die beiden extremen Gruppen lieferten zusätzlich zwei QTL für den Respiratory Health Score (RHS\*) auf Chromosom 13 und 18.

### **4.4 Phänotypen-Assoziations-Analyse**

Die QTL auf den Chromosomen 2, 6, 12 und 17 gipfelten über oder nahe den Markern Swr345 (SSC 2), KVL3285 (SSC 6), S0143 (SSC 12) und SWN335 (SSC 17). Die multiple Regressionsanalyse dieser QTL-assoziierten Marker ergab einen signifikanten Effekt der Mikrosatellitenmarker Swr345 (SSC 2) und S0143 (SSC 12) auf die phänotypischen Merkmale RHS, klinischer Score an Tag 7 p.i. und das Auftreten von Todesfällen. Zusätzlich zeigten beide Marker einen signifikanten kombinatorischen Effekt auf die drei Merkmale (Abbildung 7).

Todesfälle waren assoziiert mit dem Vorhandensein von einem Markerallel, das in homozygot empfindlicher „Version“ vorlag in Verbindung mit hetero- oder homozygot empfindlichem Allel für den anderen Marker. In keiner anderen Kombination traten Todesfälle auf. Ein ähnliches Prinzip war für die Merkmale RHS und Klinischer Score zu beobachten.

Effekte der einzelnen Marker und deren kombinatorischer Effekt waren statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ) für alle drei phänotypischen Merkmale. Die empfindlichen Allele von Swr345 (SSC 2) kamen von Hampshire, die von S0143 (SSC 12) von Landrasse.



**Abbildung 7:** Kombinatorische Effekte der Marker Swr345 und S0143 auf die phänotypischen Merkmale.

a) Todesfälle, b) Klinischer Score und c) Respiratory Health Score (RHS).

Verändert nach Reiner et al. 2014.

H: Allele von Hampshire stammend,

L: Allele von Landrasse stammend.

RHS: Respiratory Health Score.

Ergebnisse basieren auf 170 Schweinen.

Die Werte auf der y-Achse beziehen

sich jeweils auf den Prozentsatz an

toten Schweinen, dem Klinischen Score

und den RHS, für jeden der neun durch

die Marker Swr345 (SSC2) und S0143

(auf SSC12) kombinierten Genotypen.

## 5 Diskussion

### 5.1 PCR und Gelelektrophorese

Trotz optimierter PCR-Bedingungen war es nicht immer möglich, Gelelektrophoresebilder komplett ohne unspezifische Banden zu erhalten. Neben den zu erwartenden Amplifikaten erschienen zusätzliche Signale. Diese oftmals in der Intensität zunehmenden Extrabanden wurden als Stotterbanden angesprochen.

Murray et al. (1993) untersuchten das Auftreten dieser Extrabanden und fanden heraus, dass sie in der Sequenz dem Hauptamplifikat entsprechen, aber nur ein oder mehrere Wiederholungseinheiten kürzer sind. Sie schlussfolgerten, dass die Extrabanden ein Nebenprodukt der PCR darstellen, da sie im genomischen DNA template so nicht vorkommen.

Da Stotterbanden zu nicht eindeutigen Ergebnissen führen können und somit die Genotypisierung erschweren, haben Olejniczak & Krzyzosiak (2006) nach Parametern gesucht, die das Auftreten dieser Extrabanden beeinflussen. So steigt beispielsweise mit höherer „repeat number“ des Mikrosatelliten die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Stotterbanden, wobei dinukleotide Mikrosatelliten besonders dazu neigen (Goldstein & Schloetterer, 1999). Außerdem erscheinen laut Ergebnissen von Olejniczak & Krzyzosiak (2006) Stotterbanden erst ab einer Denaturierungstemperatur im PCR-Programm von 90 °C oder höher. Sie halten eine Temperatur von 85 °C im Denaturierungsschritt für optimal, um das Auftreten von Stotterbanden zu vermeiden. Außerdem besteht eine positive Korrelation zwischen der DNA-Konzentration, sowie zwischen Anzahl PCR-Zyklen und Stotterbanden. Doch trotz Berücksichtigung dieser Erkenntnisse für die PCR-Bedingungen, war es in der vorliegenden Studie nicht möglich das Auftreten von Stotterbanden komplett zu verhindern. Eine exakte Auswertung und das zweifelsfreie Ansprechen der Amplifikate wurden hiervon trotzdem nicht beeinträchtigt. Die Darstellung der Banden durch das Auswertungsprogramm als unterschiedlich hohe Peaks, machte es leicht möglich, Stotterbanden von „wahren“ Banden zu unterscheiden.

Allerdings verhinderte das Auftreten solcher „stutter bands“ das effektive Zusammenfassen der einzelnen Primerpaare zu Multiplex-Ansätzen. Die Größe der Amplifikate musste deutlicher differieren, als zunächst angenommen. Durch Überlagerung von Stotterbanden mit Amplifikaten eines anderen Primerpaares im PCR-Ansatz, war es nicht mehr möglich zwischen den verschiedenen Amplifikaten und Artefakten zu unterscheiden. So ergab sich,

dass die meisten Multiplex-Ansätze nur aus 3 Primerpaaren bestanden, obwohl das verwendete PCR-Kit eine Kapazität von bis zu 10 Produkten und mehr pro Ansatz besitzt (Qiagen Multiplex PCR Handbook, 2008).

Auch die Tatsache, dass Fragmentgrößen im Multiplex-Ansatz zu denen im Einzelansatz differieren können (Deng et al., 2000), hatte keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Essentiell war lediglich, die einzelnen Allelgrößen auf die jeweilige Eltern- und Großelterngeneration zurückverfolgen zu können.

Es kam vor, dass Marker sich in der F<sub>0</sub>-Generation als homozygot darstellten und in der F<sub>1</sub>-Generation ein Allel scheinbar fehlte. Das zu Grunde liegende Phänomen ist als „allelic drop out“ bekannt. Heterozygote Tiere scheinen nur ein Allel zu tragen. Wahr ist aber, dass ein Allel präferiert amplifiziert wird (Hahn et al., 1998). Eine andere Möglichkeit, die zu „allelic drop out“ führt, ist eine Mutation in Region der Primerbindung so dass keine Bindung und folglich keine Amplifikation stattfindet (Mutationsrate von 0,0014) (Heinrich et al., 2004). Dies führte dazu, dass nicht alle in der F<sub>0</sub>-Generation als informativ getesteten Mikrosatelliten auch für die anschließenden QTL-Berechnungen berücksichtigt werden konnten.

## **5.2 Marker**

Für diese Studie wurde sich bewusst für Mikrosatelliten als Genmarker entschieden. Die Mikrosatellitenanalyse ist ein bewährtes und im hiesigen Labor erfolgreich erprobtes Mittel, um genetische Unterschiede in Populationen zu erfassen (Reiner et al., 2002, 2007, 2008). SNPs als Marker einzusetzen bewährte sich bei Analysen des Schweinegenoms zu diesem Zeitpunkt noch nicht, da kommerziell erhältliche SNP-Chips in ihrer Entwicklung noch zu unausgereift waren und zu viele Lücken aufwiesen.

Außerdem haben die Mikrosatelliten im Vergleich zu SNPs den Vorteil einer höheren Informativität. Dies beruht auf einer geringeren Mutationsrate der SNPs ( $10^{-7}$ - $10^{-9}$  pro Meiose) bei höherer Mutationsrate der Mikrosatelliten ( $7,52 \times 10^{-5}$  pro Meiose) (Tümmler & Gerlach, 2009; Yue et al., 2002). Mikrosatelliten weisen auch phylogenetisch junge Mutationsereignisse durch Änderungen in der Anzahl der „repeats“ und eine veränderte Allelverteilung nach. Eine veränderte Allelverteilung in phänotypisch divergierenden Gruppen gibt Hinweise auf einen genetischen Modulator, der sich auch mit SNP-Chips mit

hoher Markerdichte nicht zuverlässig nachweisen lässt (Stanke et al., 2006 a,b; Tuemmler & Gerlach, 2009).

Insgesamt mussten mehr Mikrosatellitenmarker auf Informativität getestet werden als erwartet. Auch waren viele Marker, die sich in einer vorangegangenen Studie in einer Piétrain/Meishan-Kreuzung als informativ erwiesen (Reiner et al., 2007), für die Tiere der Rassen Hampshire und Deutsche Landrasse, die in vorliegender Studie verwendet wurden, nicht informativ. Dies könnte durch den genetisch gesehen engeren Verwandtschaftsgrad der Rassen Hampshire und Deutsche Landrasse im Vergleich zur französischen Rasse Piétrain und den aus China stammenden Meishanschweinen bedingt sein. Zusätzlich waren von 36 im Rahmen des IRAS-Projekts entwickelten Mikrosatellitenmarkern nur 4 (CD40, IFNAR, TNF, CD14) informativ und damit für die QTL-Berechnungen geeignet. Dies könnte auf eine mögliche individuell unterschiedliche Strategie zur Abwehr von *App* hinweisen. Möglicherweise verfolgen die für die vorliegende Studie ausgewählten Tiere einen anderen Weg in der Bekämpfung von *App* als die an IRAS beteiligten Tiere. Diese Hypothese wird auch durch die QTL-Ergebnisse dieser und einer dänischen Studie (Gregersen et al., 2010) unterstützt, deren QTL sich größtenteils ebenfalls als familienspezifisch herausstellten.

Einige wenige Lücken auf dem Genom konnten auf Grund von Markermangel nicht geschlossen werden. In den entsprechenden Bereichen wurden alle zurzeit gelisteten Mikrosatellitenmarker getestet. Eine weitere Problemzone sind die Terminalbereiche der Chromosomen, da auch hier nicht immer informative Marker verfügbar waren. Es ist demnach möglich, dass nicht alle existenten QTL tatsächlich kartiert werden konnten.

Trotzdem konnte mit einem mittleren Abstand der Mikrosatelliten von 15 cM die Voraussetzung für eine erfolgreiche positionelle Studie innerhalb der F<sub>2</sub>-Tiere geschaffen werden.

### **5.3 Gewählte Methode: QTL-Analyse**

Funktionelle Analysen liefern eine Fülle an Daten. Ergebnisse des Vorgängerprojekts IRAS lieferten beispielsweise > 1500 differentiell exprimierte Kandidatengene (Drungowski & Hoeltig, 2010). Es stellt sich jedoch die Frage, ob alle detektierten Gene auch wirklich von Relevanz sein können. Die Entscheidung welches dieser Gene für weiterführende Feinkartierungsarbeiten ausgewählt werden sollte, fällt schwer: Gene, mit unterschiedlich effizienten Transkriptionsfaktoren können auch ohne Genvariante differentiell exprimiert

werden, während die vorgeschalteten Gene aufgrund von Mutationen im kodierenden Bereich unterschiedliche Wirkung erlangen können, ohne selbst differentiell exprimiert zu sein.

Auch die QTL-Analyse kann lediglich Hinweise auf die betroffenen Chromosomenabschnitte liefern.

Diese umfassen oft weite Strecken auf dem Chromosom. Weitere aufwendige Studien müssen sich anschließen, um Unterschiede auf Gen-Ebene herauszufinden. Es ist aber durchaus möglich einen QTL für die MAS zu nutzen, auch ohne Kenntnis der zu Grunde liegenden Genvariante zu besitzen. Ein Beispiel liefert die erfolgreiche Nutzung eines QTL für die Zucht auf Resistenz gegenüber Infektiöser Pankreasnekrose beim Lachs (Houston et al. 2008; Moen et al. 2009) in kommerziellen Zuchtprogrammen (Landcatch Natural Selection Ltd., Ormsary, Scotland).

#### **5.4 QTL-Ergebnisse**

Die vorliegende Studie präsentiert die ersten QTL für das akute Geschehen einer respiratorischen Erkrankung nach standardisierter Infektion.

In vorangegangenen Studien wurde mehrfach die geringe Empfindlichkeit einer Hampshire-Population und die hohe Empfindlichkeit einer Landrassenpopulation aufgezeigt (Benga et al., 2009; Danilowicz et al., 2009; Hoeltig et al., 2009; Kahlisch et al., 2009). Als mögliche Marker für die relative Resistenz der Hampshire Population konnten ein hoher FetuinA- und Haptoglobinspiegel *post infectionem* erarbeitet werden (Benga et al., 2009; Kahlisch et al., 2009). Zusätzlich wurden Polymorphismen im Transferrin-Gen entdeckt, die mit der Schwere der Erkrankung bei Landrasse-Tieren assoziiert waren (Danilowicz et al., 2009). Die genauen genetischen Mechanismen der Krankheitsresistenz blieben aber verborgen.

Ziel dieser Studie war es, QTL für die relative Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegenüber *App* zu ermitteln. Anhand dieser als unterschiedlich empfänglich belegten Populationen, gemeinsam mit einem exakt und äußerst detailliert erfaßten Phänotyp, konnte die Studie an einer relativ kleinen Tierzahl erfolgreich durchgeführt werden.

Gregersen et al. (2010) untersuchten in einer Feldstudie über 7.400 Schweine zum chronischen Krankheitsverlauf einer *App*-Infektion. Das Ergebnis dieser Studie waren 6 chromosomenweit signifikante QTL (SSC 2, 8, 12, 13, 14, 18), allerdings jeweils in unterschiedlichen Tierfamilien. Eine Studie zur ventro-cranialen Pleuritis, an deren

Entstehung *App* teilweise auch beteiligt ist, von Sørensen et al. (2011) basiert auf derselben Tierfamilie wie Gregersens Studie, allerdings mit deutlich dichterem SNP-Chip (7k). Diese Studie lieferte QTL auf SSC 2, 4, 11, 12 und 13, wiederum in jeweils unterschiedlichen Tierfamilien.

Gregersens QTL auf den Chromosomen 2, 12, 13 und 18 und Sørensens QTL auf SSC 2, 12 und 13 konnten durch diese Studie bestätigt werden. Der QTL auf Chromosom 2 zeigte sich in der vorliegenden Studie sogar als genomweit signifikant. Konfidenzintervalle waren in Gregersens und vorliegender Studie ähnlich weit.

Der Vergleich dieser Studien unterstreicht die Bedeutung exakter Phänotypisierung. Denn nicht nur die Anzahl informativer Meiosen trägt zum Erfolg einer QTL-Analyse bei, sondern auch die Genauigkeit der Phänotypen. Trotz der vergleichsweise niedrigen Tierzahl in der vorliegenden Studie, konnten ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Lokalisation, „detection power“ und Konfidenzintervalle erzielt werden. Insbesondere beim Merkmal „Krankheitsresistenz“ führen eine unterschiedliche Aufzucht, Immunstatus, Infektionsdruck in der Herde und Infektionszeitpunkt (manche Tiere sind zum Zeitpunkt der Phänotyperhebung vielleicht schon wieder genesen) zu falscher Klassifikation der individuellen Resistenz oder Empfindlichkeit. Auch der tatsächlich ursächliche Erreger der Läsionen bleibt bei „Feldstudien“ teilweise unklar.

Das Infektionsmodell der vorliegenden Studie hat die Umwelteinflüsse gleichgeschaltet. Alle Tiere waren der gleichen Umgebung, Infektionszeitpunkt und Infektionsdosis ausgesetzt. Die Basis für ein höchst akkurates Phänotypisieren war geschaffen und so konnte die Anzahl der Individuen im Vergleich zu den dänischen Studien um 98 % gesenkt werden.

Die im Vergleich zwischen Gregersen und der vorliegenden Studie unterschiedlich kartierten QTL könnten einerseits die unterschiedlichen Phasen der Erkrankung widerspiegeln. Am chronischen Stadium der Erkrankung könnten andere Pathways beteiligt sein als unser Modell zur akuten *App*-Infektion enthüllt. Andererseits weist dieser Aspekt möglicherweise auch auf generell alternative Pathways für die Resistenzmechanismen in der Abwehr von *App* hin. Auch innerhalb ihrer Studie konnten Gregersen et al. ihre detektierten QTL nicht in jeder Tierfamilie bestätigen.

## 5.4.1 Einzelbetrachtung der ermittelten QTL

### 5.4.1.1 QTL auf SSC 2

QTL für die Merkmale Todesfälle, Röntgenscore 7 Tage p.i., RHS und klinischer Score liegen auf SSC 2. Von insgesamt 10 QTL auf SSC 2 (alle mit Peak bei 114cM) waren 5 genomweit signifikant. Der eindruckvollste QTL dieser Studie wurde für den Klinischen Score Tag 7 p.i. kartiert. Der Peak des QTL fällt genau auf die Position des Markers Swr345.

Interessanterweise sind für diesen QTL auf SSC 2 die Hampshire-Allele mit höheren Scores und somit höherer Empfindlichkeit der F<sub>2</sub>-Tiere gekoppelt. Obwohl für Populationen der Rassen Landrasse und Hampshire eine erhöhte bzw. verminderte Empfindlichkeit für *App* nachgewiesen war, wurden die ausgewählten Foundertiere nicht individuell getestet. Man kann vermuten, dass es innerhalb beider Populationen Individuen mit größeren Unterschieden bezüglich ihrer Resistenz/Empfindlichkeit gibt als es die tatsächlich ausgewählten Foundertiere widerspiegeln. Vielleicht beruht die Resistenz der Hampshire-Population aber auch auf vielen kleineren Effekten, die durch unsere Berechnungen nicht entdeckt wurden.

Die QTL auf SSC 2 für den Klinischen Score weisen mit zunehmendem Abstand vom Infektionszeitpunkt steigende F-Werte auf. Gleichzeitig schrumpft das Konfidenzintervall. Dies deutet darauf hin, dass bei einer längeren Versuchsdauer das Ergebnis noch mächtiger ausgefallen wäre. Die trotzdem begrenzte Versuchsdauer von sieben Tagen lag einerseits im Sinne des Tierschutzes, um unnötige Schmerzen und Leiden zu vermeiden. Außerdem war aus vorangegangenen Studien klar, dass die akuten Lungenläsionen der ersten Tage *post infectionem* und die Reaktion des angeborenen Immunsystems entscheidend für den Verlauf einer *App*-Infektion sind (Hoeltig et al., 2009).

Der QTL auf SSC 2 umfasst die Region von bereits beschriebenen QTL für die Resistenz von *Sarcocystis miescheriana* (Reiner et al., 2007) und für mehrere Atemwegserkrankungen wie dorso-caudale bzw. craniale chronische Pleuritis (Gregersen et al., 2010 bzw. Sørensen et al., 2011), Mykoplasmasuszeptibilität (Okamura et al., 2012) sowie eine Infektion mit dem *Pseudorabies-Virus* (Reiner et al., 2002). Okamura et al. (2012) konnten hier zusätzlich einen QTL für die Zahl der Leukozyten- und Reiner et al. (2008) für die Zahl der Monozyten kartieren. Wimmers et al. (2009) erarbeiteten hier einen QTL für das Komplementsystem, ein wichtiges Element des angeborenen Immunsystems. Diese hohe studienübergreifende

Übereinstimmung der Ergebnisse unterstreicht wie bedeutungsvoll diese chromosomale Region für Merkmale der Krankheitsresistenz zu sein scheint.

Das enge Konfidenzintervall des QTL auf SSC 2 ermöglicht eine „lohnende“ Suche nach Kandidatengen. Obgleich auch dieses Konfidenzintervall über 90 Gene umfasst. Als dem QTL unterliegende, mögliche Kandidaten kommen die Gene für die Interleukine (IL) 4, 5, 13 und 9 sowie die Faktoren CD14, IRF1, CXCL14, CSF2, TRPC7, ETF1, LMNB1 und HSPA9 in Betracht.

Da bekannt ist, dass die angeborene Abwehr entscheidend zur Bekämpfung von *App* beiträgt, liegt es nah Variationen in mit dem unspezifischen Immunsystem assoziierten Genen als ursächlich für die unterschiedliche Resistenzlage anzunehmen.

Von den Interleukin-Genen liegt das IL-9-Gen am nächsten zum QTL-Peak. Seine Position ist bei 143.648.289-143.651.957 bp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Dieses IL-9 wird unter anderem von T-Helferzellen sezerniert und aktiviert über Bindung an den IL-9-Rezeptor verschiedene STAT-(Signal Transducer and Activator) Proteine und ist so Schaltstelle für eine Reihe sehr wichtiger biologischer Prozesse (Maglott et al., 2005). IL-9 wird eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen zugesprochen (Soussi-Gounni et al., 2001; Brough et al., 2014). Über die Induktion einer IL-13-Expression führt es zu inflammatorischen Prozessen der Atemwege und ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese von bronchialen Hyperreaktivitäten (Maglott et al., 2005; Temann et al., 2007). Mittlerweile wurde IL-9 als Kandidatengen für Asthma identifiziert (Aschard et al., 2009). Zusätzlich wirkt IL-9 nach Infektion mit Gram-negativen Bakterien immunmodulatorisch. Durch Suppression pro-inflammatorischer Cytokine wie TNF $\alpha$ , IL-12 und Interferon- $\gamma$  und gleichzeitiger Induktion des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 ist es in der Lage den Organismus vor einem tödlichen Endotoxin-Schock zu bewahren (Grohmann et al., 2000).

Neben IL-9 wird den Interleukinen 4 (140.455.331-140.462.879 bp), 5 (140.301.708-140.303.645 bp) und 13 (140.441.135-140.443.605 bp) eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von Asthma zugesprochen (Li & Hendriks, 2013). IL-4 ist ein Regulator von Entzündungs- und Immunreaktionen. Nach LPS-Kontakt unterdrückt IL-4 die Produktion weiterer Cytokine wie IL-1, IL-8 und TNF durch Alveolarmakrophagen und moduliert so die weitere Entzündungskaskade (Zhou et al., 1994). LPS ist einer der Hauptvirulenzfaktoren von *App* und IL-8 wiederum ist ein starkes „chemoattractant“ für neutrophile Granulozyten. Durch Abminderung der massiven Neutrophileneinwanderung könnte der Schaden für umliegendes Wirtsgewebe abgeschwächt werden. Auf der anderen Seite aktiviert IL-4 zusammen mit IL-

13 Lungenmakrophagen, die wiederum entscheidend für die Entstehung von chronischen Lungenerkrankungen beim Menschen sind (Byers & Holtzmann, 2011). Die herausragende Bedeutung der IL-4 und 13 unterstreicht die neueste Entwicklung von Lungentherapeutika für chronische Atemwegserkrankungen beim Menschen. Mittlerweile durchlaufen Anticytokine 4 und 13 mit vielversprechenden Ergebnissen die klinische Testphase (Kau & Korenblat, 2014). IL-13 fungiert außerdem gemeinsam mit IL-5 als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für B-Zellen (Maglott et al., 2005). Ein möglicher Hinweis für die Bedeutung von B-Zell-assoziiierter Resistenz gegen *App*.

Das Colony-Stimulating-Factor (CSF2)-Gen befindet sich an Position 139.706.386-139.708.817 bp. Er kontrolliert die Produktion, Differenzierung und Funktion von Granulozyten und Makrophagen. In Bezug auf Atemwegserkrankungen ist von Maus-Modellen bereits bekannt, dass der CSF maßgeblich die Immunantwort auf Infektionen mit Influenza (Sever-Chroneos et al., 2011), Klebsiellen (Standiford et al., 2012) und Streptokokken (Steinwede et al., 2011) moduliert. Es konnte gezeigt werden, dass der CSF positive Auswirkungen auf die bakterielle Clearance hat, die Apoptoserate vermindert und vor Bakteriämien schützen kann (Standiford et al., 2012; Steinwede et al., 2011). Neuere Forschungen zeigen eine bislang unbekannte CSF-IgM-Achse auf. Die von CSF stimulierte IgM-Expression von B-Zellen, die von der Pleura ins Lungenparenchym einwandern, bildet eine effektive frühe Abwehr gegen bakterielle Erreger (Weber et al., 2014). Wobei porcine Alveolarmakrophagen 5 Std. nach LPS-Stimulation die höchsten CSF-Expression zeigen (Cho et al., 2003).

Auch das Gen für CD14 (Cluster of Differentiation) liegt in der Nähe des QTL-Peaks auf SSC 2 (148.291.451-148.293.622 bp). Zusätzlich erwies sich der in Vorbereitung auf diese Studie extra entwickelte Mikrosatellitenmarker in unserer Tierfamilie als informativ, was die Stellung dieses Gens als Kandidatengen unterstreichen könnte. CD14 spielt eine wichtige Rolle in der Initiierung der angeborenen Immunantwort gegenüber dem LPS Gram-negativer Bakterien. Als membranassoziiertes Protein wird es hauptsächlich auf Monozyten bzw. Makrophagen exprimiert und initiiert nach Interaktion mit TLR-4 eine LPS-spezifische Immunantwort in weiteren Zellen (Sanz et al., 2007; Qiu et al., 2007). Es ist ein MYD88-abhängiger oder unabhängiger Signalweg möglich, MYD88 wiederum ist ein mögliches Kandidatengen im Bereich des QTL auf SSC 13. Aus der Humanmedizin ist bereits bekannt, dass ein Polymorphismus im CD14-Gen zur erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Tuberkulose beiträgt (Areeshi et al., 2013).

IRF1 (Interferon-regulatory-factor-1) reguliert die Genexpression von Interferonen. Die Position des IRF1-Gens ist auf SSC 2 im Bereich 140.229.799-140.252.658 bp. Es konnte gezeigt werden, dass ein SNP im porzinen IRF1-Gen die Interferon- $\gamma$ -Serumkonzentration beeinflusst (Liu et al., 2011). Interferon- $\gamma$  wird von T-Zellen produziert nachdem sie in Kontakt mit Makrophagen kommen, welche vorher ein Bakterium phagozytiert haben. Interferon- $\gamma$  wiederum hat eine stimulierende Wirkung auf Makrophagen. Unter anderem wird hier die Phagosom-Lysosombildung unterstützt. Dies könnte einen entscheidenden Beitrag zur relativen Krankheitsresistenz leisten, wurde doch von einer Hemmung des Phagosom-Lysosoms durch *App* berichtet (Bossé et al., 2002). Makrophagen wiederum führen via Up-Regulation von Vitamin-D-Rezeptor- und Vitamin-D-Hydroxylase-Genen zur Produktion des antimikrobiellen Peptids Cathelicidin. In Bezug auf Tuberkulose wurde schon von einer erhöhten Anfälligkeit auf Grund von niedrigen Vitamin-D-Spiegeln und folglich verminderter Bildung von Cathelicidinen berichtet (Liu et al., 2006). Von der Bedeutung der Cathelicidine in der Abwehr von *App* wurde schon von Hennig-Pauka et al. (2006) berichtet.

Das Zytokin CXCL14 (Chemokine (C-X-C motif) Ligand 14) an Position 143.444.416-143.453.547 bp auf SSC 2 wirkt chemotaktisch auf Monozyten. Allerdings wird seine Rolle eher in der Homöostase von aus Monozyten entstandenen Makrophagen gesehen, als in einer direkten Beteiligung an Entzündungsprozessen (Maglott et al., 2005).

TRPM2 (143.969.145-144.151.823) ist ein Gen für einen Kalzium-permeablen-Kationen-Kanal und nimmt Einfluss auf Zelltod durch oxidativen Stress. Eine humanmedizinische Studie untersuchte die Rolle von TRPM2 in der Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Stress. Sie konnten zeigen, dass bestimmte Isoformen von TRPM2 mit erhöhter oder erniedrigter Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffradikalen einhergehen (Chen et al., 2013). *App*-Infektionen sind charakterisiert durch massive Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Ramjeet et al., 2005). Dies führt zu einem extrem mit Sauerstoffradikalen angereicherten Umfeld. Ein Polymorphismus in diesem Kationenkanal könnte auch im Rahmen einer *App*-Infektion hier Zelluntergang modulieren. Zusätzlich ist bekannt, dass die Wirkung der von *App* produzierten Apx-Toxine kalziumabhängig sind (Inzana, 1991; Rycroft & Garside, 2000).

Auch das multipotente Chaperon HSPA9 (heat shock protein9) (146230081-146246720 bp) schützt vor oxidativem Stress. Es bewahrt die hämatopoetische Stammzellfunktion trotz

vorherrschenden reaktiven Sauerstoffverbindungen (Tai-Nagara et al., 2014). Zusätzlich ist bekannt, dass HSPA9 an Komplementfaktor C9 bindet und die Bildung des Membranagriffkomplexes inhibiert. Dies wird als Teil des Schutzes der Wirtszellen vor komplementabhängiger Zytotoxizität angesehen (Saar Ray et al., 2014).

ETF1 (Eukaryotic Translation Termination Factor) (SSC 2; 146.187.943-146.219.340 bp) könnte als Translationsfaktor ebenfalls Einfluss auf die Resistenz/Empfindlichkeit zeigen.

#### **5.4.1.2 QTL SSC 17**

Für RHS und Klinischer Score Tag 7 p.i. wird zusätzlich ein QTL auf SSC 17 kartiert. Dieser liegt bei Mikrosatellitenmarker Swn335. Auch hierfür kamen die un favorisierten Allele von der Hampshire-Population.

Dieser Abschnitt auf Chromosom 17 trägt erst spät nach der Infektion zur Resistenz/Empfänglichkeit bei. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass entscheidende Aspekte der Abwehr zeitlich unterschiedlich anlaufen. Gestützt wird diese Vermutung von vorangegangenen Studien, die auch schon zeitlich unterschiedlich startende Prozesse der Abwehr aufzeigen konnten. Es wurde beispielsweise von einer verspäteten Einwanderung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bei der resistenteren Rasse Hampshire und von einem späten Anstieg von Interferon- $\gamma$  im Plasma bei Landrasse berichtet (Benga et al., 2009; Kahlisch et al., 2009).

Das Konfidenzintervall überspannt mit einer Weite von ungefähr 90 cM fast das gesamte Chromosom mitsamt über 900 Genen. Das Eingrenzen und Auswählen möglicher Kandidatengene ist demnach kaum möglich. Vielleicht wäre auch für diesen QTL mit steigendem Tag p.i ein engeres Konfidenzintervall und somit eindeutigeres Ergebnis möglich gewesen.

Allerdings bestätigt dieser QTL auf SSC 17 andere Studien, die hier auch schon QTL bezüglich Immunmerkmalen kartieren konnten. Beispielsweise konnten QTL für die Haptoglobinkonzentration detektiert werden (Wimmers et al., 2009). Über die bedeutende Rolle von Haptoglobin während einer *App*-Infektion wurde schon berichtet (Benga et al., 2009; Kahlisch et al., 2009; Skovgaard et al., 2010). In der Studie von Benga et al. (2009) spiegelte die Haptoglobinkonzentration p.i. die klinische Manifestation wieder. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen klinischem Score und Plasma-Haptoglobinwerten. Empfindlichere Rassen zeigten p.i. einen signifikanten Anstieg der Plasma-Haptoglobinkonzentration. Für die resistenteren Rasse Hampshire konnte insgesamt keine signifikante Änderung der Plasmakonzentration verzeichnet werden, obwohl für einzelne

Individuen der Hampshire-Population sehr wohl ansteigende Haptoglobinwerte gefunden wurden. Dies könnte erklären warum auch für diesen QTL in unserer Studie die Hampshire-Allele mit den unfavorisierten Scores assoziiert sind.

Uddin et al. (2011) konnten auf SSC 17 ein QTL für TLR-9-Serumkonzentration berechnen. Toll-Like-Rezeptoren erkennen PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) und gelten als Verknüpfungsglied zwischen angeborener und erworbener Abwehr (Takeda & Akira, 2004; Uenishi & Shinkai, 2009). TLR-Polymorphismen sind mit der Empfindlichkeit gegenüber infektiösen Erkrankungen assoziiert, auch bezüglich Pneumonien (Schneberger et al., 2011; Shinkai et al., 2006). Wobei sich das Gen für TLR-9 auf SSC 13 befindet, wo diese Studie auch einen QTL kartieren konnte.

Zusätzlich konnten QTL für Interferon- $\gamma$  Level (Uddin et al., 2010) und segmentkernige neutrophile Granulozyten (Reiner et al., 2008) auf SSC 17 gefunden werden. Interferon- $\gamma$  ist ein wichtiger Aktivator der Makrophagen und konnte für das Schwein als Marker für akute bakterielle Infektionen erarbeitet werden (Yao et al., 2008; Uddin et al., 2010). Wobei in Bezug auf *App* rasseabhängige Besonderheiten aufgedeckt werden konnten. Einerseits, dass eine positive Korrelation zwischen IFN- $\gamma$ -Level und Klinischem Score für Piétrain und Edelschwein bestehen kann. Und andererseits, dass die resistanteste Rasse Hampshire keinen signifikanten Anstieg, die empfindlichste Rasse als einzige einen signifikanten Anstieg von IFN- $\gamma$ -Plasmalevel aufzeigt. Dies war allerdings auch erst spät nach der Infektion aufgetreten (Benga et al., 2009), ebenso wie der kartierte QTL der vorliegenden Studie. Ein möglicher Hinweis auf die Bedeutung von IFN-  $\gamma$  im vorliegenden Infektionsmodell.

#### 5.4.1.3 QTL SSC 6

Dieser QTL konnte zwar nicht von Gregersen und Kollegen kartiert werden, allerdings befindet sich hier auch ein QTL für die Resistenz von *Pseudorabies* (Reiner et al., 2002) und ein QTL für Leukozytenanzahl nach respiratorischer infektiöser Erkrankung (Okamura et al., 2012). Zusätzlich fallen auch QTL für Komplementsystem (Wimmers et al., 2009) und IL-2-Level (Uddin et al., 2011) in den Bereich unseres QTL. Während das Komplementsystem ein wichtiger Faktor der unspezifischen Abwehr ist, regt IL-2 einerseits die Bildung weiterer Interleukine und Interferone, andererseits die Proliferation von B- und T-Zellen an (Maglott et al., 2005). Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung des angeborenen Immunsystems bei der Abwehr von *App* .

Dieser QTL auf SSC 6 für Sonographie Score 7 Tage p.i. und RHS umfasst einen weiten Bereich auf dem Chromosom mit mindestens 325 Genen, was auch hier die Suche und

Eingrenzung möglicher Kandidatengene erschwert. Interessante Kandidatengene im Bereich des QTL-Maximums sind *PLCG2* (6.994.249-7.063.454 bp) und *CDH13* (5.214.298-5.364.555 bp).

*PLCG2* (Phospholipase C Gamma 2) ist ein Signalmolekül, das von B-Zellen, natürlichen Killerzellen und Mastzellen exprimiert wird (Ombrello et al., 2012). Es ist sowohl an der T- als auch B-Zell-Antwort beteiligt und trägt entscheidend zur Formation und Erhaltung der Gedächtniszellen bei (Fu et al., 2012; Hikida et al., 2009). Mutationen in diesem Gen werden in Zusammenhang mit Autoinflammation, Antikörperdefizienz und Immundysregulationssyndrom gebracht. Autoinflammationen sind durch eine abnorme Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet (Zhou et al., 2012). Ein Merkmal, das auch die Pathogenese von *App* maßgeblich kennzeichnet.

*CDH13* (Cadherin 13) ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche und schützt u.a. Gefäßendothelzellen vor Apoptose nach oxidativem Stress (Maglott et al., 2005). „Oxidative burst“ nach Einwanderung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wirkt auch zerstörerisch auf die eigenen Zellen, ein Schutz davor könnte die Läsionen im Zuge der porzinen Pleuropneumonie mindern.

#### 5.4.1.4 SSC 12

Auf SSC12 wurden in dieser Studie QTL für den Sonographie Score und RHS kartiert. Interessanterweise wurde hier ein QTL sowohl für Sonographie Tag 0 als auch Tag 7 p.i. berechnet. Dies ist ein Hinweis auf grundlegende Unterschiede in der Lungensonographie unabhängig von der Infektion.

Auf SSC 12 wurden in vorherigen Studien u.a. schon QTL für chronische Pleuritis aus Gregersens (2010) und Sørensens Studie (2011), für Mykoplasma-Suszeptibilität (Okamura et al., 2012) und für IL-10-Level kartiert (Uddin et al., 2011). Interleukin 10 gilt als antiinflammatorisches Zytokin und ist in die Regulation des JAK (Januskinase)-STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) Pathways involviert (Maglott et al., 2005). *STAT3* (20.709.840-20.775.694 bp), *STAT5A* (24.563.982-24.581.115 bp) und *STAT5B* (20.807.655-20.864.509 bp) wiederum sind unserem QTL unterliegende mögliche Kandidatengene. Die herausragende Bedeutung dieses Wegs der Signaltransduktion wird deutlich, wenn man bedenkt, dass Interferone, fast alle Interleukine und „colony-stimulating-factor“ alle den JAK-STAT Pathway benutzen (O’Shea et al., 2013).

#### 5.4.1.5 SSC 16

Dieser QTL auf SSC 16 wurde zwar nicht von Gregersens Studie zur chronischen Pleuritis detektiert, aber es befindet sich hier ein QTL für die Leukozytenanzahl während einer Mykoplasmeninfektion (Okamura et al., 2012). Außerdem befinden sich auf SSC 16 weitere QTL für Immunparameter wie beispielsweise QTL für Komplement C3C (Wimmers et al., 2009), TLR-9 (Uddin et al., 2011) und Interferon- $\gamma$  (Uddin et al., 2010). Zusätzlich wurden bei Schweinen nach Impfung mit dem Erreger der Klassischen Schweinepest 16 SNPs mit Assoziation zur CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation und zum Verhältnis von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen gefunden (Lu et al., 2012).

Auch dieser QTL umfasst nahezu das gesamte Chromosom und beinhaltet annähernd 600 Gene. Mögliche Kandidaten mit Assoziation zum QTL-Peak sind die Gene für IL7R, FYB, C7 und C6.

IL7R (IL7 Rezeptor), dessen Gen sich an Position 22.282.647-22.313.191 bp befindet, bindet IL-7, welches die Maturation sowohl von B- als auch T-Zellen stimuliert (Corcoran et al., 1996; Kallies, 2008). Polymorphismen im IL7R-Gen stehen in der Humanmedizin in Zusammenhang mit SCID (severe combined immunodeficiency), einer gravierenden Störung der gesamten erworbenen Immunität (Safaei et al., 2011).

Das FYB-Gen (FYN Binding Protein) befindet sich an Position 25.520.008-25.621.408 bp. Es kodiert für ein Protein, das an der T-Zell-Signalkaskade und Thrombozytenaktivierung beteiligt ist (Maglott et al., 2005). Unter anderem entstehen durch Aktivierung der Gerinnungskaskade und daraus resultierender Thrombenbildung die typisch nekrotischen Läsionen der prozinen Pleuropneumonie (Bossé et al., 2002). Außerdem ist FYB an der Expressionsmodulation von Interleukin 2 beteiligt ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)), der wiederum Wachstumsfaktor für T-Zellen ist.

C6 (27.211.345-27.261.841 bp) und C7 (27.055.926-27.111.985 bp) kodieren für Proteine des Komplementsystems. Die Komponenten C6 und C7 sind Teil des Membranangriffskomplex (MAC), welcher in der Zielzelle Lysis auslöst (Maglott et al., 2005).

#### 5.4.1.6 SSC 13

Auf diesem Chromosom kartiert ein QTL für RHS der jeweils 50 empfindlichsten bzw. resistentesten Tiere (RHS\*) aus dieser Studie und ein QTL für Phagozytenaktivität (Okamura et al., 2012) und chronische Pleuritis (Gregersen et al., 2010, Sørensen et al., 2011) aus anderen Studien zur Lungengesundheit.

Leider umfasst dieser QTL das gesamte Chromosom mit insgesamt 2.115 verschiedenen Genen. Doch die Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Studien zur Lungengesundheit und im Speziellen zu *App* und die Besonderheit, dass er die unterschiedlich empfindlichen Gruppen dieser Studie abbildet, rechtfertigen einen näheren Blick. Interessante Kandidatengene sind TF, TFRC, FETUA, MYD88, IL12A und TLR-9.

Vielversprechende Kandidatengene im Bereich des QTL sind das Transferrin (TF) an Position 82.429.010-82.469.005 bp und das Transferrinrezeptorgen (TFRC; 143.414.634-143.435.426 bp). Bakterien finden sich im Wirtskörper als Teil der Wirtsabwehr in einer Eisenmangelumgebung wider (Klitgaard et al., 2010). Die Eisenbeschaffung ist folglich essentiell für das Überleben von *App* und mitverantwortlich für die Virulenz (Bossé et al., 2002; Chiers et al., 2010). Über die Rolle von Polymorphismen im Transferrin und deren Assoziation zur Empfindlichkeit gegenüber *App* wurde schon von Danilowicz et al. (2009) berichtet.

Auch über die Rolle von FetuinA (FETUA; 133.821.520-133.828.638 bp) in Zusammenhang mit einer *App*-Infektion gibt es Erkenntnisse (Kahlisch et al., 2009). FetuinA hat eine negative Auswirkung auf neutrophile Granulozyten. Bekanntermaßen kommt es während einer *App*-Infektion zu einer exzessiven Neutrophilen-Antwort. Dieser auch für wirtseigenes Gewebe schädlichen Reaktion wirkt FetuinA entgegen. So konnten hohe FetuinA-Level bei Tieren der Rasse Hampshire mit der Absenz von Läsionen assoziiert werden.

MYD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88; 25.179.767-25.185.356 bp) ist ein entscheidender Signaltransducer in der Interleukin1-Rezeptor/Toll-Like-Rezeptor Signalkaskade. Am Ende der Kaskade steht die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen wie  $IFN\alpha$ , IL-6 und  $TNF\alpha$  (Janeway & Medzhitov, 2002; Tohno et al., 2007). Die herausragende Rolle dieses MYD88-abhängigen Pathways zeigen beispielsweise MYD88-defiziente Mäuse, die keine Immunantwort auf von TLR erkannte PAMP aufweisen. Und Menschen mit einem Defekt in diesem Gen weisen eine erhöhte Suszeptibilität für pyogene bakterielle Infektionen auf (Maglott et al., 2005; Takeuchi et al., 2000).

IL-12 besteht aus zwei Subeinheiten, IL-12A und IL-12B (Maglott et al., 2005). Das Gen für IL-12A befindet sich an Position 108.066.792-108.074.477 bp. IL-12 ist wichtig für die Differenzierung von TH1- und TH2-Zellen und stellt so ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort dar (Miteva & Stanilova, 2008). Ein Polymorphismus im humanen IL-12A-Gen scheint zur genetischen Empfänglichkeit für COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung) beizutragen, eine bedeutende Lungenerkrankung in der Humanmedizin (Wang et al., 2012).

Wie bereits erwähnt sind die Familie der TLR ein wichtiges Element der PAMP-Erkennung und Aktivierung der angeborenen Abwehr (Schneberger et al., 2011; Maglott et al., 2005). TLR-9 liegt bei 37.634.180-37.652.019 bp. TLR-9 wird in der Humanmedizin als mitentscheidender Faktor in Zusammenhang mit viralen Lungenerkrankung gesehen. Neue Forschungen weisen eine Beteiligung an dem Fortschreiten der humanen idiopathischen Lungenfibrose nach. Virale Infektionen sind Teil der Pathogenese und über eine dauerhafte Aktivierung von TLR-9 kommt es zu einem raschen Fortschreiten der Erkrankung (Kirillov et al., 2015). Eine andere Studie wiederum berichtet von erhöhter antiviraler Abwehr gegen Influenza durch TLR-9-induzierter IFN- $\beta$  Produktion (Lin et al., 2015). Auch die Studie von Rogers et al. (2015) weist eine bedeutende Rolle von TLR-9 für die virale Abwehr nach. Ein Verlust des TLR-9/MYD88 (wiederum auch Kandidatengen auf SSC 13)-Signalwegs führte zu einer verminderten T-Zell-Antwort.

#### 5.4.1.7 SSC 18

Für SSC 18 wurden neben den QTL für Lungen-Läsions-Score, Re-Isolations-Score und RHS\* auch eine Reihe anderer QTL für Immunmerkmale kartiert. Unter anderem für Komplement (C3C) (Wimmers et al., 2009), IL10 (Uddin et al., 2011), IFN- $\gamma$  (Uddin et al., 2010), TLR-9 (Uddin et al., 2011), *Mycoplasma hyopneumoniae* Antikörperspiegel (Uddin et al., 2010) und chronische Pleuritis (Gregersen et al., 2010). Zusätzlich überlappt dieser QTL mit einem QTL für Lymphozytenanzahl ermittelt an einem chronischem Krankheitsmodell (Reiner et al., 2008). Zusätzlich wurden auch auf SSC18 SNPs in Assoziation zu T-Zellsubpopulationen gefunden (CD4+, Verhältnis CD4+/CD8+ und CD4+/CD8-) (Lu et al., 2012).

Dieser QTL umspannt fast das gesamte Chromosom. Mögliche Kandidatengene im Bereich des Peaks sind Vitronectin (VTN), Stickoxidsynthase (NOS3), Thromboxan A Synthase1 (TBXAS1), mir4337/mir29b/mir29a.

Vitronectin (5.021-8.468 bp) interagiert mit dem Komplementsystem und inhibiert die Formation des Membranangriffkomplexes. Von *Haemophilus influenzae* ist bekannt, dass die Bindung von VTN förderlich für dessen Überleben im Serum ist und so zu einer erfolgreichen Kolonisation und folglich Infektion beiträgt (Hallström et al., 2006, 2009; Su et al., 2013). Zusätzlich hat Vitronectin eine antiapoptotische Wirkung auf neutrophile Granulozyten (Bae et al., 2012) und verhindert den Abtransport von totem Zellmaterial durch phagozytische Zellen (Bae et al., 2013). Für die Entstehung der für eine *App*-Infektion typischen Nekrosen

könnte weiterhin die stabilisierende Wirkung von VTN auf Thromben und die Förderung von Gefäßverschlüssen verantwortlich sein (Reheman et al., 2005).

Stickoxide sind reaktive freie Radikale, die u.a. als biologischer Mediator bei der antimikrobiellen Abwehr dienen (Maglott et al., 2005). In Bezug auf Lungenerkrankungen wurde ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im Stickoxidsynthase 3-Gen (6.579.253-6.602.572 bp) und der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen beim Menschen vermutet, der so jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnte (Aminuddin et al., 2013).

Die Thromboxan A Synthase katalysiert die Entstehung von Thromboxan A<sub>2</sub>. Dies ist ein potenter Vasokonstriktor und Inducer der Thrombozytenaggregation (Maglott et al., 2005). Wie bereits erwähnt sind die Entstehung von Thromben und als deren Folge nekrotisches Gewebe typisch für die Pathogenese der porzinen Pleuropneumonie. Das Gen TBXAS1 liegt an Position (10.223.766-10.394.083 bp).

Mikro-RNA's sind kurze nicht kodierende RNA, die in die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression involviert sind (Maglott et al., 2005; Reiner & Willems, 2010).

#### **5.4.2 Zwischenfazit zur QTL-Analyse**

Diese Studie basiert auf einer relativ geringen Tier- (170) und Markeranzahl (159). Und trotzdem gibt es eine hohe Übereinstimmung von Ergebnissen dieser Studie und einer anderen an über 7.400 Tieren und 7k SNP Chip (Gregersen et al., 2010). Sowohl die Lage und Mächtigkeit der QTL, als auch Konfidenzintervalle weisen eine hohe Konformität auf. Schlüssel hierzu ist der äußerst akkurat und detailliert erfasste Phänotyp dieser Studie. Dennoch könnten in dieser Studie die teilweise großen Markerabstände und fehlende Marker im Terminalbereich von Chromosomen dazu geführt haben, dass QTL entweder unterschätzt oder sogar nicht detektiert wurden.

Obwohl mögliche Kandidatengene andiskutiert wurden, muss man bedenken, dass Konfidenzintervalle groß sind und viele mögliche Kandidatengene beinhalten können. Dennoch erleichtern kartierte QTL die Suche nach Kandidatengen und sind ein erster Schritt in Richtung Selektionszucht. Allerdings sind nachfolgende Studien von Nöten, um die QTL-Regionen genauer zu charakterisieren. Die Kombination der Ergebnisse dieser positionellen Studie mit funktionellen Daten sollte es ermöglichen die Zahl an Kandidatengen einzugrenzen und solche zu finden, die an der *App*-Resistenz/Suszeptibilität beteiligt sind.

### 5.4.3 Kombination positioneller und funktioneller Studien

Sowohl funktionelle als auch positionelle Studien allein führen zu einer Vielzahl an Kandidatengenen. Durch Kombination beider Analysen (QTL- und e-QTL-Analyse) gelingt es Kandidatengene zu ermitteln. Wobei solche von besonderer Bedeutung sind, deren Genexpressionslevel von einem e-QTL auf demselben Chromosom/Gen beeinflusst wird. Nur hier lohnt die Suche nach Genvarianten (Hoeltig et al., 2013).

In einer nachfolgenden Analyse wurden von den jeweils 50 am schwersten und am leichtesten erkrankten Tieren dieser Studie Expressionsdaten ermittelt und e-QTL berechnet. Es wurden 171 signifikant differentiell exprimierte Gene ermittelt und 193 e-QTL für 105 differentiell exprimierte Gene erarbeitet (Hoeltig et al., 2013; Reiner et al., 2014b). Die meisten Genexpressionslevel (fast 90 %) waren allerdings trans-reguliert, d.h. die Regulation der Expression ist auf anderen Chromosomen zu finden als das differentiell exprimierte Gen selbst. Insgesamt muss man schlussfolgern, dass das differentielle Expressionsmuster in diesem Fall kaum direkte Hinweise auf zugrundeliegende Gene bzw. Genvarianten liefert. Es ergaben sich vielmehr „funktionelle Hotspots“ auf den Chromosomen 2, 18 und besonders 13 von wo aus die Expression reguliert wird. Der Hotspot auf SSC 13 beinhaltet 55 e-QTL und gibt Hinweise auf mögliche Kandidatengene: TF (Transferrin), TFRC (Transferrinrezeptor), RUNX1 (Runt Related Transcription Factor1), TCN1 (Transcobalamin 1), HP (Haptoglobin) und CD14 (Glykoprotein 14) (Hoeltig et al., 2012).

Eine herausragende Stellung nimmt das Transferrin-Gen ein. Seine Rolle als mögliches Kandidatengen wurde durch die e-QTL-Analyse untermauert. Das TF-Gen auf SSC 13 ist differentiell exprimiert und sowohl ein QTL als auch ein e-QTL (cis) kartieren hier. Dieser e-QTL hat einen hohen F-Wert und erklärt fast 60 % der Varianz. Allerdings ist der Lod-Score relativ niedrig. Daraus kann man schließen, dass dieser e-QTL die Expressionsmenge zwar gut erklärt, die Expressionsmenge aber wenig Einfluß auf den Overall-Phänotyp Krankheitsresistenz/-empfindlichkeit hat, da zwischen den beiden Gruppen kaum Unterschied ist. Auch der Hinweis auf den Transferrinrezeptor als mögliches Kandidatengen wird durch die e-QTL-Analyse unterstützt.

Auch das nahe des QTL-Peak auf SSC 2 gelegene mögliche Kandidatengen CD14 konnte bestätigt werden. Wohingegen TCN1 bei der Interpretation der QTL-Ergebnisse erstmal nicht im Fokus war, da nicht direkt unter dem QTL-Peak auf SSC 2 positioniert. Das kodierte Protein zu TCN1 ist Hauptbestandteil der Granula neutrophiler Granulozyten (Maglott et al.,

2005). Das Gen TCN1 liegt im Bereich unseres QTL, ein e-QTL kartiert auf SSC 2, zusätzlich wird es vom funktionellen Hotspot auf SSC13 kontrolliert (Hoeltig et al., 2012).

### **5.5 Marker-Phänotyp-Assoziationen**

Ein herausragendes Ergebnis dieser Studie sind die QTL, die auf SSC 2 und SSC 12 direkt über den Markern Swr345 und S0143 kartiert wurden. Jedes aufgrund von *App* verstorbene Schwein war homozygot in Bezug zu den Ausgangsrassen für einen Marker und hatte gleichzeitig wenigstens ein unfavorisiertes Allel im anderen Marker. Wie bereits erwähnt, ist interessanterweise das „Hampshire-Allel“ bei Swr345 mit dem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert. Für S0143 ist wie erwartet das „Landrassen-Allel“ mit dem unvorteilhaften Krankheitsgeschehen assoziiert.

Es ist folglich anzunehmen, dass beide Mikrosatellitenmarker in der F<sub>2</sub>-Generation mit interessanten Genvarianten gekoppelt sind. Eventuell könnten sie sich sogar als nicht funktionelle Marker eignen. Allerdings müsste vor einer züchterischen Nutzung weitere Untersuchungen bewerkstelligt werden, denn wahrscheinlich ist die Kopplung zwischen Marker und kausalen Genvarianten „zu locker“ um in kommerziellen Populationen zu bestehen.

### **5.6 Fazit**

Die klinischen QTL zeigen, dass selektierbare Genorte für die Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber *App* vorhanden sind. Aufgrund der noch relativ und absolut weiten Konfidenzintervalle kann die Suche nach Kandidatengenen nicht allein auf Ergebnissen dieser QTL-Studie fußen. Doch sie sind die Basis für tiefere Analysen. In Kombination mit funktionellen Studien konnten erste mögliche Kandidatengene eingegrenzt werden.

Aufgrund der Komplexität der Pathogenese- und Abwehrmechanismen ist eine absolute Resistenz kaum zu erwarten. Aber auch eine nur relative Resistenz hätte erhebliche, positive Auswirkungen auf die weltweite Schweineproduktion. Immerhin war bei Tieren ohne klinische Symptomatik nach 96 Stunden p.i. kein Erreger mehr im Organismus nachweisbar (Hoeltig et al., 2012). Dies senkt massiv den Infektionsdruck in einer Herde und kann so die Weiterverbreitung der Krankheit eindämmen (Reiner, 2009). Die Anwendung von Markern für die Resistenz in der Selektionszucht kann zu einer Verbesserung der Performance, einer niedrigeren Krankheitsinzidenz, einem verbessertem Tierschutz und zu höherer Produktqualität (weniger Einsatz von Antibiotika) führen.

In einem Folgeprojekt könnte die Suche nach SNPs in den Kandidatengenomen und Assoziationsstudien starten. Dies wäre anhand von Tieren der Deutschen Landrasse möglich, da DL-Tiere mit segregierender *App*-Resistenz vorhanden sind.

Ob die erarbeiteten Marker auch Auswirkungen auf die Empfänglichkeiten gegenüber anderen Erregern haben, muss abgeklärt und negative Interaktionen müssen ausgeschlossen werden. Grundsätzlich wäre allerdings denkbar, dass eine erhöhte Resistenz gegenüber *App* auch positive Auswirkungen auf die Empfindlichkeiten gegenüber verwandten Erregern hat (Hoeltig et al., 2013).

## 6 Zusammenfassung

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*) ist der Erreger der porzinen Pleuropneumonie und gehört zu den weltweit bedeutendsten Pathogenen beim Schwein. Die hervorgerufene Erkrankung zeichnet sich durch eine hämorrhagische und nekrotisierende Pneumonie und fibrinöse Pleuritis aus. Ernsthafte wirtschaftliche Schäden werden durch Leistungseinbußen, akute oder chronische Pleuropneumonie und das vermehrte Auftreten von Todesfällen verursacht. Bislang ist keine zufriedenstellende Vakzine zur Eindämmung der Erkrankung verfügbar. Gleichzeitig mahnt das vermehrte Auftreten von Antibiotikaresistenzen zum vorsichtigen therapeutischen Einsatz von Medikamenten. Für die Zukunft müssen neue Strategien zur Beherrschung der porzinen Pleuropneumonie entwickelt werden. Die Erlangung tiefergehender Erkenntnisse zu genetischen Hintergründen einer natürlichen Resistenz wirft gleichzeitig auch neues Licht auf Erreger-Wirts-Interaktionen und zugrunde liegende Krankheitsmechanismen. Diese neu gewonnenen Feststellungen könnten somit nicht nur die Züchtung von resistenteren Tieren unterstützen, sondern auch Inspiration für neue Prophylaxemechanismen sein.

Ziel dieser Studie war es, Quantitative Trait Loci (QTL) für die Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber *App* zu kartieren. Unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen wurden 170 F<sub>2</sub>-Tiere einer Hampshire/Landrassen-Familie einem Infektionsversuch mit *App* Serotyp 7 unterzogen. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Ausgangspopulationen wurde in Vorversuchen erarbeitet. Anschließend an die Infektion mit dem *App*-Aerosol folgte eine detaillierte klinische, radiologische, ultrasonographische, pathologische und bakteriologische Untersuchung. Alle Phänotypen wurden vom Kooperationspartner AG Waldmann der Stiftung Tierärztliche Hochschule, Hannover, erhoben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die F<sub>2</sub>-Tiere anhand von 159 Mikrosatellitenmarkern genotypisiert und die QTL-Analysen durchgeführt. Insgesamt wurden 22 signifikante QTL für die *Sus scrofa*-Chromosomen (SSC) 2, 6, 12, 13, 16, 17 und 18 kartiert. Diese konnten 6-22 % der phänotypischen Varianz erklären. Ein QTL auf SSC2 erreichte für 5 assoziierte phänotypische Merkmale genomweite Signifikanz. Eine multiple Regressionsanalyse offenbarte einen signifikanten kombinatorischen Effekt der Marker Swr345 (SSC2) und S0143 (SSC12) auf die Merkmale „Respiratory Health Score“, Klinischer Score und Auftreten von Todesfällen. Diese Studie kartiert die ersten QTL für die akute Phase der *App*-Infektion. Die Ergebnisse liefern neue Erkenntnisse zu genetischen Hintergründen der Resistenz/Empfindlichkeit

---

gegenüber *App* und sind ein erster Schritt in Richtung der Identifikation von zu Grunde liegenden Resistenzmechanismen und Genvarianten.

## 7 Summary

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*) is the causative agent of porcine pleuropneumonia. This disease is characterized by a hemorrhagic and necrotizing pneumonia and fibrinous pleuritis. *App* is among the most important pathogens in pig production worldwide. It causes severe economic losses due to decreased performance, acute or chronic pleuropneumonia and increased death rate. Until now there is no vaccine available that provides sufficient protection against any aspect of the disease. In addition, the emergence of antibiotic resistance asks for a careful use of antibiotics. For future prophylaxis and control of the disease, it is essential to develop antibiotic-independent measures. Obtaining knowledge of the genetic background of natural disease resistance also provides a deeper understanding of host-pathogen interaction and underlying disease mechanisms. These new findings might not only support the selection towards more disease resistant pigs, but might also be inspiring for the development of new prophylactic measures.

Aim of this study was to detect quantitative trait loci (QTL) for the resistance/susceptibility to *App*. Under controlled and standardized conditions 170 F<sub>2</sub>-animals of a Hampshire/Landrace family were infected with an *App*-serotype 7 aerosol. Different susceptibilities of the founder populations were investigated and proved in former studies. Infection followed a comprehensive and detailed clinical, radiographic, ultrasonographic, pathological and bacteriological examination. All phenotypes were examined and collected by our co-operation partner in Hannover (K.-H. Waldmann, University of Veterinary Medicine Hannover Foundation, Germany). As part of this work F<sub>2</sub>-pigs were genotyped with 159 microsatellite markers and QTL-analysis was performed. QTL-analysis revealed 22 significant QTL on SSC 2, 6, 12, 13, 16, 17 and 18. These QTL explained 6-22 % of total phenotypic variance. One QTL on SSC 2 reached genomwide significance for five associated traits. Multiple regression analysis uncovered a significant combinatory effect of the markers Swr345 (SSC 2) and S0143 (SSC 12) on the phenotypic traits „Respiratory Health Score“, Clinical Score and the occurrence of deaths.

This study presents the first QTL for the acute onset of *App*-infection. Findings of this study shed light on the genetic background of disease resistance/susceptibility regarding porcine pleuropneumonia. Chromosomal regions contributing to disease resistance were discovered and are a first step towards the identification of resistance mechanisms and causal gene variants.



## 8 Literaturverzeichnis

- Abul-Milh M., Paradis S.E., Dubreuil J.D. & Jacques M. (1999) Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infection and Immunity* 67, 4983-7.
- Ait-Ali T., Wilson A.D., Westcott D.G., Clapperton M., Waterfall M., Mellencamp M.A., Drew T.W., Bishop S.C. & Archibald A.L. (2007) Innate immune response to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated swine alveolar macrophages. *Viral Immunology* 20, 105-18.
- Ajito T., Haga Y., Homma S., Goryo M. & Okada K. (1996) Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 58, 297-303.
- Alexander L.J., Troyer D.L., Rohrer G.A., Smith T.P., Schook L.B. & Beattie C.W. (1996a) Physical assignments of 68 porcine cosmid and lambda clones containing polymorphic microsatellites. *Mammalian Genome* 7, 368-72.
- Alexander L.J., Rohrer G.A. & Beattie C.W. (1996b) Cloning and characterization of 414 porcine microsatellites. *Animal Genetics* 27, 137-48.
- Al-Mazrou K.A. & Al-Khattaf A.S. (2008) Adherent biofilms in adenotonsillar diseases in children. *Archives of Otolaryngology, Head Neck Surgery*, 134, 20-3.
- Aminuddin F., Hackett T.L., Stefanowicz D., Saferali A., Paré P.D., Gulsvik A., Bakke P., Cho M.H., Litonjua A., Lomas D.A., Anderson W.H., Beaty T.H., Silverman E.K. & Sandford A.J. (2013) Nitric oxide synthase polymorphisms, gene expression, and lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulmonary Medicine* 13, 64.
- Areeshi M.Y., Mandal R.K., Panda A.K., Bisht S.C. & Haque S. (2013) CD14 - 159 C>T Gene Polymorphism with Increased Risk of Tuberculosis: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS ONE* 8, e64747.
- Aschard H., Bouzigon E., Corda E., Ulgen A., Dizier M.H., Gormand F., Lathrop M., Kauffmann F., Demenais F. & EGEA Cooperative Group (2009) Sex-specific effect of IL9 polymorphisms on lung function and polysensitization. *Genes and Immunity* 10, 559-65.
- Ashwell M. S., Heyen D. W., Weller J. I., Ron M., Sonstegard T. S., Van Tassell C. P. & Lewin H.A. (2005) Detection of quantitative trait loci influencing conformation traits and

- calving ease in Holstein-Friesian cattle. *Journal of Dairy Science* 88, 4111-9.
- Auger E., Deslandes V., Ramjeet M., Contreras I., Nash J.H.E., Harel J., Gottschalk M., Olivier M. & Jacques M. (2009) Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infection and Immunity* 77, 1426-41.
- Baarsch M.J., Scamurra R.W., Burger K., Foss D.L., Maheswaran S.K. & Murtaugh M.P. (1995) Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 63, 3587-94.
- Bae H.B., Tadie J.M., Jiang S., Park D.W., Bell C.P., Thompson L.C., Peterson C.B., Thannickal V.J., Abraham E. & Zmijewski J.W. (2013) Vitronectin inhibits efferocytosis through interaction with apoptotic cells as well as with macrophages. *Journal of Immunology* 190, 2273-81.
- Bae H.B., Zmijewski J.W., Deshane J.S., Zhi D., Thompson L.C., Peterson C.B., Chaplin D.D. & Abraham E. (2012) Vitronectin inhibits neutrophil apoptosis through activation of integrin-associated signaling pathways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 46, 790-6.
- Baerwald M.R., Petersen J.L., Hedrick R.P., Schisler G.J. & May B. (2011) A major effect quantitative trait locus for whirling disease resistance identified in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity* 106, 920-6.
- Baltes N. & Gerlach G.F. (2009) Identification of genes transcribed by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in necrotic porcine lung tissue by using selective capture of transcribed sequences. *Infection and Immunity* 72, 6711-6.
- Baltes N., Hennig-Pauka I. & Gerlach G.F. (2002) Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiology Letters* 209, 283-7.
- Baltes N., Hennig-Pauka I., Jacobsen I., Gruber A.D. & Gerlach G.F. (2003a) Identification of dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in infection. *Infection and Immunity* 71, 6784-92.
- Baltes N., N'diaye M., Jacobsen I.D., Maas A., Buettner F.F.R. & Gerlach G.F. (2005) Deletion of the anaerobic regulator HlyX causes reduced colonization and persistence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine respiratory tract. *Infection and Immunity* 73, 4614-9.
- Baltes N., Tonpitak W., Hennig-Pauka I., Gruber A.D. & Gerlach G.F. (2003b) *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae serotype 7 siderophore receptor FhuA is not required for virulence. *FEMS Microbiol Letters* 220, 41-8.
- Baltes N., Topitak W., Gerlach G.F., Hennig-Pauka I., Hoffmann-Moujahid M., Ganter M. & Rothkotter H.J. (2001) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. *Infection and Immunity* 69, 472-8.
- Bates J.S., Petry D.B., Eudy J., Bough L. & Johnson R.K. (2008) Differential expression in lung and bronchial lymph node of pigs with high and low responses to infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Animal Science* 86, 3279-89.
- Bao W.B., Wu S.L., Musa H.H., Zhu G.Q. & Chen G.H. (2008) Genetic variation at the alpha-1-fucosyltransferase (FUT1) gene in Asian wild boar and Chinese and Western commercial pig breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 125, 427-30.
- Beh K. J., Hulme D. J., Callaghan M. J., Leish Z., Lenana I., Windon R. H. & Maddox J. F. (2002) A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Animal Genetics* 33, 97-106.
- Bélanger M., Bégin C. & Jacques M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infection and Immunity* 63, 656-62.
- Bélanger M., Dubreuil D. & Jacques M. (1994) Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 62, 868-73.
- Benga L., Hoeltig D., Rehm T., Rothkoetter H.J., Pabst R., Valentin-Weigand P. & FUGATO-consortium IRAS (2009) Expression levels of immune markers in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs and their relation to breed and clinical symptoms. *BMC Veterinary Research* 5, 13.
- Bennewitz J. (2009) Die Grundlagen der genomischen Selektion. Beitrag zum Rinderworkshop vom 17.-18. Februar 2009 in Uelzen, Deutschland.
- Berge T. (2008) Genomweite Kartierung von QTL zur Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber *Sarcocystis miescheriana* beim Schwein. Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.
- Bertschinger H.U. & Fairbrother J.M. (1999) *Escherichia coli* infections. *Diseases of Swine*, Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ (eds) 8th edn. Iowa State University Press, Ames, IA, 431-68.

- Bilinski T. (1991) Oxygen toxicity and microbial evolution. *Biosystems* 24, 305-12.
- Biscarini F., Bovenhuis H., van Arendonk J.A., Parmentier H.K., Jungerius A.P. & van der Poel J.J. (2010) Across-line SNP association study of innate and adaptive immune response in laying hens. *Animal Genetics* 41, 26-38.
- Bishop SC, Axford RFE, Nicholas FW, Owen JB (2010) Breeding for disease resistance in farm animals, 3rd edn. . CAB International, Wallingford, United Kingdom, 5.
- Bisset S.A., Morris C.A., JC McEwan J.C. & Vlassoff A. (2001) Breeding sheep in New Zealand that are less reliant on anthelmintics to maintain health and productivity. *New Zealand Veterinary Journal* 49(6), 236-46.
- Blackall P.J., Klaasen H.L.B.M., van den Bosch H., Kuhnert P. & Frey J. (2002) Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Veterinary Microbiology* 84, 47-52.
- Blackwell J.M. (1996) Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Molecular Medicine Today* 2, 205-11.
- Boddicker N.J., Bjorkquist A., Rowland R.R., Lunney J.K., Reesy J.M. & Dekkers J.C. (2014) Genome-wide association and genomic prediction for host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Genetics Selection Evolution* 46, 18.
- Boddicker N., Waide E.H., Rowland R.R.R., Lunney J.K., Garrick D.J., Reesy J.M. & Dekkers J.C.M (2012) Evidence for a major QTL associated with host response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus challenge. *Journal of Animal Science* 90, 1733-46.
- Boekema B.K.H.L., Van Putten J.P.M., Stockhofe-Zurwieden N. & Smith H.E. (2004) Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 72, 691-700.
- Bossé J.T., Gilmour H.D. & MacInnes J.I. (2001) Novel genes affecting urease activity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 183, 1242-7.
- Bossé J.T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S. & Langford P.R. (2002) *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection* 4, 225-35.
- Bossé J.T. & MacInnes J.I. (2000) Urease activity may contribute to the ability of

- Actinobacillus pleuropneumoniae to establish infection. Canadian Journal of Veterinary Research 64, 145-50.
- Bossé J.T., Johnson R.P., Nemec M. & Rosendal S. (1992) Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1. Infection and Immunity 60(2), 479-84.
- Bossé J.T., Sinha S., Li M.-S., O'Dwyer C.A., Nash J.H.E., Rycroft A.N., Kroll J.S. & Langford P.R. (2010) Regulation of pga Operon Expression and Biofilm Formation in Actinobacillus pleuropneumoniae by  $\sigma$ E and H-NS. Journal of Bacteriology 9, 2414-23.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. T & Davis R.W (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics 32, 314-31.
- Broman K.W. (2001) Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. Lab Animal 30, 44-52.
- Brown J.F. & Archibald A.L. (1995) Two porcine microsatellite loci (S0033 and S0035). Animal Genetics 26, 277.
- Brown J.F., Hardge T., Rettenberger G. & Archibald A.L. (1994) Four new porcine polymorphic microsatellite loci (S0032, S0034, S0036, S0037). Animal Genetics 25, 365.
- Brough H.A., Cousins D.J., Munteanu A., Wong Y.F., Sudra A., Makinson K., Stephens A.C., Arno M., Ciortuz L., Lack G. & Turcanu V. (2014) Il-9 is a key component of memory TH cell peanut-specific responses from children with peanut allergy. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 134, 1329-38.
- Buettner F.F.R., Konze S.A., Maas A. & Gerlach G.F. (2011) Proteomic and immunoproteomic characterization of a DIVA subunit vaccine against Actinobacillus pleuropneumoniae. Proteome Science 9, 23.
- Buske B., Sternstein I. & Brockmann G. (2006) QTL and candidate genes for fecundity in sows. Animal Reproduction Science 95, 167-83.
- Byers D.E. & Holtzmann M.J. (2011) Alternatively activated macrophages and airway disease. Chest 140, 768-74.
- Calenge F., Lecerf F., Demars J., Feve K., Vignoles F., Pitel F., Vignal A., Velge P., Sellier N. & Beaumont C. (2009) QTL for resistance to Salmonella carrier state confirmed in both experimental and commercial chicken lines. Animal Genetics 40, 590-7.

- Cameron H.S., Hughes E.H. & Gregory P.W. (1942) Genetic resistance to brucellosis in swine. *Journal of Animal Science* 1, 106-10.
- Campbell E.M., Fahrenkrug S.C., Vallet J.L., Smith T.P. & Rohrer G.A. (2001) An updated linkage and comparative map of porcine chromosome 18. *Animal Genetics* 32, 375-9.
- Campbell E.M.G, Nonnemann D. & Rohrer G.A. (2003) Fine mapping a QTL affecting ovulation rate in swine on chromosome 8. *Journal of Animal Science* 81, 1706-14.
- Casas E. & Stone R. T. (2006) Putative quantitative trait loci associated with the probability of contracting infectious bovine keratoconjunctivitis. *Journal of Animal Science* 84, 3180-4.
- Cerschoor C.P., Pant S.D., You Q., Schenkel F.S., Kelton D. & Karrow N.A. (2010) Polymorphisms in the gene encoding bovine interleukin-10 receptor alpha are associated with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection status. *BMC Genetics* 11, 23.
- Chiers K., de Waele T., Pasmans F., Ducatelle R. & Haesebrouck F. (2010) Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Veterinary Research* 41, 65.
- Chiers K., Donné E., Overbeke I.V., Ducatelle R. & Haesebrouck F. (2002) *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Veterinary Microbiology* 85, 343-52.
- Chiers K., Haesebrouck F., van Overbeke I., Charlier G. & Ducatelle R. (1999) Early *in vivo* interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Veterinary Microbiology* 68, 301-6.
- Cho W.S. & Chae C. (2002) Expression of Nitric Oxide Synthase 2 and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in swine naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Pathology* 39, 27-32.
- Cho Y.W., Lee D.Y., Shin S.J., Shin N.R., Kang S.G., Choi I.S. & Yoo H.S. (2003) Kinetic study of porcine GM-CSF expression in porcine alveolar macrophages and spleen cells. *FEMS Immunology and medical Microbiology* 39, 61-7.
- Choi C., Kwon D., Min K. & Chae C. (1999) In-situ hybridization for the detection of inflammatory cytokines (IL-1, TNF-alpha and IL-6) in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 121, 349-56.
- Chen S., Zhang W., Tong Q., Conrad K., Hirschler-Laszkiwicz I., Bayerl M., Kim J.K., Cheung J.Y. & Miller B.A. (2013) Role of TRPM2 in cell proliferation and susceptibility

- to oxidative stress. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology* 304, 548-60.
- Chung J.W., Ng-Thow-Hing C., Budman L.I., Gibbs B.F., Nash J.H.E., Jacques M. & Coulton J.W. (2007) Outer membrane proteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: LC-MS/MS analyses validate in silico predictions. *Proteomics* 7, 1854-65.
- Churchill G.A. & Doerge R.W. (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963-71.
- Cleveland-Nielsen A., Nielsen E.O. & Ersbol A.K. (2002) Chronic pleuritis in Danish slaughter pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* 55, 121-35.
- Cole R.K. (1968) Studies on genetic resistance to Marek's disease. *Avian Diseases* 12, 9-28.
- Coddens A., Verdonck F., Mulinge M., Goyvaerts E., Miry C., Goddeeris B., Duchateau L. & Cox E. (2008) The possibility of positive selection for both F18 (+) *Escherichia coli* and stress resistant pigs opens a new perspective for pig breeding. *Veterinary Microbiology* 26, 210-5.
- Coppieters W., Van de Weghe A., Peelman L., Depicker A., Van Zeveren A. & Bouquet Y. (1993) Characterization of porcine polymorphic microsatellite loci. *Animal Genetics* 24, 163-70.
- Crawford A.M., Paterson K.A., Dodds K.G., Diez Tascon C., Williamson P.A., Roberts Thomson M., Bisset S.A., Beattie A.E., Greer G.J., Green R.S., Wheeler R., Shaw R.J., Knowler K. & McEwan J.C. (2006) Discovery of quantitative trait loci for resistance to parasitic nematode infection in sheep: I. Analysis of outcross pedigrees. *BMC Genomics* 7, 178.
- Crujisen T.L.M., van Leengoed L.A.M.G., Dekker-Nooren T.C.E.M., Schoevers E.J., Verheijden J.H.M. (1992) Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infection and Immunity* 60, 4867-71.
- Crujisen T., van Leengoed L.A., Ham-Hoffies M. & Verheijden J.H.M. (1995b) Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. *Infection and Immunity* 63, 2341-3.
- Crujisen T.L.M., van Leengoed L.A.M.G., Kamp E.M., Bartelse A., Korevaar A. & Verheijden J.H.M. (1995a) Susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs from an endemically infected herd is related to the presence of toxin-neutralizing antibodies.

- Veterinary Microbiology 47, 219-28.
- Corcoran A.E., Smart F.M., Cowling R.J., Crompton T., Owen M.J. & Venkitaraman A.R. (1996) The interleukin-7 receptor alpha chain transmits distinct signals for proliferation and differentiation during B lymphopoiesis. *The EMBO Journal* 15, 1924-32.
- Courtney C.H., Parker C.F., McClure K.E. & Herd R.P (1985) Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* 15, 101-9.
- Cullen J.M. & Rycroft A.N. (1994) Phagocytosis by pig alveolar macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype-2 mutant strains defective in hemolysin-II (ApxII) and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology* 140, 237-44.
- Damerval C., Maurice A., Josse J.M. & de Vienne D. (1994) Quantitative trait loci underlying gene product variation - A novel perspective for analysing regulation of genome expression. *Genetics* 137, 289-301.
- Daniłowicz E., Martinez-Arias R., Dolf G., Singh M., Probst I., Tümmler B., Hölting D., Waldmann K.H., Gerlach G.F., Stanke F., Leeb T. & FUGATO-consortium IRAS (2009) Characterization of the porcine transferrin gene (TF) and its association with disease severity following an experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Animal Genetics* 41, 424-7.
- Darvasi A. & Soller M. (1994) Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics* 138, 1365-73.
- Darvasi A., Weinreb A., Minke V., Weller J. I. & Soller, M. (1993) Detecting Marker-QTL Linkage and Estimating QTL Gene Effect and Map Location Using a Saturated GeneticMap. *Genetics* 134, 943-51.
- Davies G., Stear M. J., Benothman M., Abuagob O., Kerr A., Mitchell S. & Bishop S. C. (2006) Quantitative trait loci associated with parasite infection in Scottish blackface sheep. *Heredity* 93, 252-58.
- Davies W., Høyheim B., Chaput B., Archibald A.L. & Frelat G. (1994) Characterization of microsatellites from flow-sorted porcine chromosome 13. *Mammalian Genome* 5, 707-11.
- Dear D.V. & Miller J.R. (1994) Isolation of dinucleotide repeats from a pig chromosome 1-specific DNA library. *Mammalian Genome* 5, 649-51.

- Deneer H.G. & Potter A.A. (1989) Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis* 6, 425-32.
- Deng H.W., Zhou Y., Recker R.R., Johnson M.L., Li J. (2000) Fragment size difference between multiplex and singleplex PCR products and their practical implications. *Biotechniques* 29, 298-304, 307-8.
- Ding X., Zhang X., Yang Y., Ding Y., Xue W., Meng Y., Zhu W. & Yin Z. (2014) Polymorphism, Expression of Natural Resistance-associated Macrophage Protein 1 Encoding Gene (NRAMP1) and its association with immune traits in pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Science* 27, 1189-95.
- Donlan R.M. & Costerton J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 167-93.
- Donis-Keller H., Green P., Helms C., Cartinhour S., Weiffenbach B., Stephens K., Keith T.P., Bowden D.W., Smith D.R., Lauder E.S. et al. (1987) A genetic linkage map of the human genome. *Cell Press* 51, 319-37.
- Dom P., Haesebrouck F. & De Baetselier P. (1992) Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. *American Journal of Veterinary Research* 53, 1113-8.
- Dom, P., Haesebrouck F., Ducatelle R. & Charlier G.(1994). *In vivo* association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infection and Immunity* 62, 1262-7.
- Donaldson A.I. & Alexandersen S. (2001) Relative resistance of pigs to infection by natural aerosols of FMD virus. *Veterinary Record* 148, 600-2.
- Drake T. A., Schadt E. E. & Lusis A. J. (2006) Integrating genetic and gene expression data: application to cardiovascular and metabolic traits in mice. *Mammalian Genome* 17, 466-79.
- Dreyfuß A., Schaller A., Nivollet S., Segers R.P.A.M., Kobisch M., Mieli L., Soerensen V., Hussy D., Miserez R., Zimmermann W., Inderbitzin F. & Frey J. (2004) Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the Apx IV Elisa. *Veterinary Microbiology* 99, 227-38.
- Drungowski M., Hoeltig D. und die Mitglieder des FUGATO-Konsortiums RePoRI (2010)

- Identification of strain specific marker genes for *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pig. Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada, 609.
- Duff J.P., Scott W.A., Wilkes M.K. & Hunt B. (1996) Otitis in a weaned pig: a new pathological role for *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*, *Veterinary Record* 139, 561-63.
- Dubreuil J.D., Jacques M., Mittal K.R. & Gottschalk M. (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal Health Research Reviews* 1, 73-93.
- Edfors-Lilja I., Gustafsson U., Duval-Iflah Y., Ellergren H., Johansson M., Juneja R.K., Marklund L. & Andersson L. (1995) The porcine intestinal receptor for *Escherichia coli* K88ab, K88ac: regional localization on chromosome 13 and influence of IgG response to the K88 antigen. *Animal Genetics* 26, 237-42.
- Edfors-Lilja I., Wattrang E., Magnusson U. & Fossum C. (1994) Genetic variation in parameters reflecting immune competence of swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 40, 1-16.
- Edfors-Lilja I., Wattrang E., Marklund L., Moller M., Andersson-Eklund L., Andersson L. & Fossum, C. (1998) Mapping quantitative trait loci for immune capacity in the pig. *The Journal of Immunology* 160, 829-35.
- Ellegren H., Chowdhary B.P., Johansson M., Marklund L., Fredholm M., Gustavsson I. & Andersson L. (1994) A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics* 137, 1089-100.
- Enriquez-Verdugo I., Guerrero A.L., Serrano J.J., Godinez D., Rosales J.L., Tenorio V. & de la Garza M. (2004) Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology* 150, 2391-400.
- Erickson A.K., Baker D.R., Bosworth B.T., Casey T.A., Benfield D.A. & Francis D.H. (1994) Characterization of porcine intestinal receptors for the K88ac fimbrial adhesin of *Escherichia coli* as mucin-type sialoglycoproteins. *Infection and Immunity* 62, 5404-10.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Fenwick B. & Henry S. (1994) Porcine pleuropneumonia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204, 1334-40.
- Fodor L., Varga J., Molnár É. & Hajtós I. (1989) Biochemical and serological properties of

- Actinobacillus pleuropneumoniae biotype 2 strains isolated from swine. *Veterinary Microbiology* 20, 173-80.
- Fredholm M., Winterö A.K., Christensen K., Kristensen B., Nielsen P.B., Davies W. & Archibald AL (1993) Characterization of 24 porcine (dA-dC)<sub>n</sub>-(dT-dG)<sub>n</sub> microsatellites: genotyping of unrelated animals from four breeds and linkage studies. *Mammalian Genome* 4, 187-92.
- Frey J. (2003) Detection, identification and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Methods in Molecular Biology* 216, 87-95.
- Frey J. (1995) Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiology* 3, 257-61.
- Frey J, Bossé J.T., Chang Y.-F., Cullen J.M., Fenwick G.F., Gerlach G.F., Gygi D., Haesebrouck F., Inzana T.J., Jansen R., Kamp E.M., Macdonald J., Macinnes J.I., Mittal K.R., Nicolet J., Rycroft A.N., Segers R.P.A.M., Smits M.A., Stenbaek E., Struck D.K., Van Den Bosch J.F., Willson P.J. & Young R. (1993) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology*, 139, 1723-8.
- Fu G., Chen Y., Schuman J., Wang D. & Wen R. (2012) Phospholipase C  $\gamma$ 2 plays a role in TCR signal transduction and T cell selection. *Journal of Immunology* 189, 2326-32.
- Fu W.X., Yang Liu Y., Lu X., Niu X.Y., Ding X.D., Liu J.F. & Zhang Q. (2012) A genome-wide Association Study Identifies Two Novel Promising Candidate Genes Affecting *Escherichia coli* F4ab/F4ac Susceptibility in Swine. *PLoS ONE* 7, e32127.
- Fuller T.E., Martin S., Teel J.F., Alaniz G.R., Kennedy M.J. & Lowery D.E. (2000) Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microbial Pathogenesis* 29, 39-51.
- Gao C., Jiang Q., Guo D., Liu J., Han L. & Qu L. (2014) Characterization of swine leukocyte antigen (SLA) polymorphism by sequence-based and PCR-SSP methods in Chinese Bama miniature pigs. *Developmental & Comparative Immunology* 45, 87-96.
- Garcia M. D., Matukumalli L., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Smith T.P.L. & Casas E. (2010) Markers on bovine chromosome 20 associated with carcass quality and composition traits and incidence of contracting infectious bovine keratoconjunctivitis. *Animal Biotechnology* 21, 188-202.
- Genco C.A. & White Dixon D. (2001) Emerging strategies in microbial haem capture.

- Molecular Microbiology 39, 1-11.
- Gerlach G.F., Anderson C., Potter A.A., Klashinsky S. & Willson P.J. (1992) Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 60, 892-8.
- Gheyas A.A., Haley C.S., Guy, D.R., Hamilton A., Tinch A. E., Mota-Velasco J.C. & Woolliams J.A. (2010) Effect of a major QTL affecting IPN resistance on production traits in Atlantic salmon. *Animal Genetics* 41, 666-8.
- Goldstein D.B. & Schloetterer C. (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford
- Gottschalk M. (2007) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes, pathogenicity and virulence. American Association of Swine Veterinarians, 38th Annual Meeting Proceedings, March 3-6, 2007, 381-384, Orlando, Florida
- Green P., Falls K. & Crooks S. (1990) Documentation for CRI-MAP, version 2.4. Washington University, School of Medicine, St. Louis, MO, USA.
- Gregersen V.R., Sørensen K.K., Christensen O.F., Busch M.E., Vingborg R.K.K., Velander I.H., Lund M.S. & Bendixen C. (2010) Identification of QTL for dorso-caudal chronic pleuritis in 12 crossbred porcine families. *Animal Genetics* 41, 509-14.
- Grimm D.R., Goldman T., Holley-Shanks R., Bouen L., Mendiola J., Schook L.B., Louis C., Rohrer G.A. & Lunney J.K. (1997) Mapping of microsatellite markers developed from a flow-sorted swine chromosome 6 library. *Mammalian Genome* 8, 193-9.
- Groenen M.A., Ruyter D., Verstege E.J., de Vries M. & van der Poel JJ (1995) Development and mapping of ten porcine microsatellite markers. *Animal Genetics* 26, 115-8.
- Grohmann U., van Snick J., Campanile F., Silla S., Giampietri A., Vacca C., Renauld J.C., Fioretti M.C. & Pucetti P. (2000) IL-9 protects mice from Gram-negative bacterial shock: suppression of TNF-alpha, IL-12, and IFN-gamma, and induction of IL-10. *Journal of Immunology* 164, 4197-203.
- Guo X.L., Xu N.Y., Looft C., Reinsch N. & Kalm E. (2004) Amplification of pig microsatellite markers using multiplex PCR (ch). *Yi Chuan* 26, 40-4.
- Gutiérrez-Martín C.B., García Del Blanco N., Blanco M., Navas J. & Rodríguez-Ferri E.F. (2006) Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Veterinary Microbiology* 115, 218-22.
- Guy S.Z.Y. Thomson P.C. & Hermes S. (2012) Selection of pigs coping with health and

- environmental challenges: breeding for resistance or tolerance? *Frontiers in Genetics* 3, 281.
- Haesebrouck F., Chiers K., van Overbeke I. & Ducatelle R. (1997) *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology* 58, 239-49.
- Hahn S., Garvin A.M., Di Naro E. & Holzgreve W. (1998) Allele Drop-Out can occur in alleles differing by a single nucleotide and is not alleviated by preamplification or Minor Template Increments. *Genetic Testing* 2, 351-5.
- Halbur P., Rothschild M.F. & Thacker B. (1998) Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire and Meishan pigs to infection with a high-virulence strain (VR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS). *Journal of Animal Breeding and Genetics* 115, 181-9.
- Haley C. S. & Andersson, L. (1997) Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals. *Genome Mapping*. Dear PH, ed. Oxford, New York, Tokio: IRL Press, 49-71
- Haley C. S., Knott S. A., Elsen J. M. (1994) Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136, 1195-207.
- Haley C.S. & Knott S.A. (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69, 315-24.
- Haller O., Frese M. & Kochs G. (1998) Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Review Scientific and Technical, Office of International Epizootics* 17, 220-30.
- Hallström T., Blom A.M., Zipfel P.F. & Riesbeck K. (2009) Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. *Journal of Immunology* 183, 2593-601.
- Hallström T., Trajkovska E., Forsgren A. & Riesbeck K. (2006) *Haemophilus influenzae* surface fibrils contribute to serum resistance by interacting with vitronectin. *Journal of Immunology* 177, 430-6.
- Hannan P.C., Bhogal B.S. & Fish J.P. (1982) Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Research in Veterinary Science* 33, 76-88.
- Hayes B., & Goddard M. E (2001) The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. *Genetics Selection Evolution* 33, 209-29.
- He D.N., Zhang X.M., Liu K., Pang R., Zhao J., Zhou B. & Chen P.Y. (2014) *In vitro* inhibition

- of the replication of classical swine fever virus by porcine Mx1 protein. *Antiviral Research* 104,128-35.
- Hedegaard J., Skovgaard K., Mortensen S., Sørensen P., Jensen T.K., Hornshøj H., Bendixen C. & Heegaard P.M.H. (2007) Molecular characterisation of the early response in pigs to experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* using cDNA microarrays. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49, 11.
- Heifetz E.M., Fulton J.E., O'Sullivan N.P., Arthur J.A., Wang J., Dekkers J.C.M. & Soller M. (2007). Mapping quantitative trait loci affecting susceptibility to Marek's disease virus in a backcross population of layer chickens. *Genetics* 4, 2417-31.
- Heinrich M., Müller M., Rand S., Brinkmann B. & Hohoff C. (2004) Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region. *International Journal of Legal Medicine* 118, 361-3.
- Hennig-Pauka I. (2006) Respiratory disease markers in porcine bronchoalveolar lavage fluid. *Habilitationsschrift. Tierärztliche Hochschule, Hannover, Deutschland.*
- Hennig-Pauka I., Jacobsen I., Blecha F., Waldmann K.H. & Gerlach G.F. (2006) Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Veterinary Research* 37, 75-87.
- Hennig-Pauka I., Koch R., Hoeltig D., Gerlach G.F., Waldmann K.H., Blecha F., Brauer C. & Gasse H. (2012) PR-39, a porcine host defence peptide, is prominent in mucosa and lymphatic tissue of the respiratory tract in healthy pigs and pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Research Notes* 5, 539.
- Hepp S. (2006) Phänotypische und genetische Parameter ausgewählter klinischer und klinisch-chemischer Merkmale zur Charakterisierung der Resistenz gegenüber *Sarcocystis miescheriana* im F2 -Modell beim Schwein. *Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität Giessen, Deutschland.*
- Heringstad B., Klemetsdal G. & Ruane J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the nordic countries. *Livestock Production Science* 64, 95-106.
- Higgins R., Lariviere S., Mittal K.R., Martineau G.P., Rousseau P. & Cameron J. (1985) Evaluation of a killed vaccine against porcine pleuropneumoniae due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Canadian Veterinary Journal* 26, 86-9.

- Hikida M., Casola S., Takahashi N., Kaji T., Takemori T., Rajewsky K. & Kurosaki T. (2009) PLC-gamma2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 681-9.
- Hoeltig D. (2009) Vergleichende klinische Untersuchungen an Ferkeln der Rassen Deutsche Landrasse, Hampshire und Piétrain und Deutsches Edelschwein hinsichtlich unterschiedlicher Erkrankungsgrade nach einer Aerosolinfektion mit *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Dissertationsschrift, Tierärztliche Hochschule, Hannover, Deutschland.
- Hoeltig D., Hennig-Pauka I., Thies K., Rehm T., Beyerbach M., Strutzberg-Minder K., Gerlach G.F., Waldmann K.-H. & FUGATO-consortium IRAS (2009) A novel Respiratory Health Score (RHS) supports a role of acute lung damage and pig breed in the course of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *BMC Veterinary Research* 5, 14.
- Hoeltig D., Reiner G., Herwig R., Tümmler B., Waldmann K.H. (2012) Einfluss der Genetik auf den Erkrankungsgrad nach einer *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Infektion. In: Vortragsband bpt-Kongress 2012 Schwein, Rind, Geflügel, Lebensmittelsicherheit. Bpt-Kongress 2012, 82-87.
- Hoeltig D., Waldmann K.H., Reiner G. (2013) *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Infektion - Untersuchungen zur genetisch bedingten Empfänglichkeit von Schweinen. *Tierärztliche Umschau* 68, 533-41.
- Holl J.W., Cassady J.P. & Johnson R.K. (2004) A genome scan for quantitative trait loci and imprinted regions affecting reproduction in pigs. *Journal of Animal Science* 82, 3421-9.
- Holmberg M. & Andersson-Eklund L. (2004) Quantitative trait loci affecting health traits in Swedish dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 87, 2653-9.
- Holmgren N., Lundeheim N. & Wallgren, P. (1999) Infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Fattening Pigs. Influence of Piglet Production Systems and Influence on Production Parameters. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 46, 535-44.
- Hong Y.H., Kim E.S., Lillehoj H.S., Lillehoj E.P. & Song K.D. (2009) Association of resistance to avian coccidiosis with single nucleotide polymorphisms in the zyxin gene. *Poultry Science* 88, 511-8.
- Houston R.D., Davey J.W., Bishop S.C., Lowe N.R., Mota-Velasco J.C., Hamilton A., Guy D.R., Tinch A.E., Thomson M.L., Blaxter M.L., Gharbi K., Bron J.E. & Taggart J.B.

- (2012) Characterisation of QTL-linked and genome-wide restriction site-associated DNA (RAD) markers in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics* 13, 244.
- Houston R.D., Haley C.S., Hamilton A., Guy D.R., Mota-Velasco J.C., Gheyas A.A., Tinch A.E., Taggart J.B., Bron J.E., Starkey W.G., McAndrew B.J., Verner-Jeffreys D.W., Paley R.K., Rimmer G.S., Tew I.J. & Bishop S.C. (2010) The susceptibility of Atlantic salmon fry to freshwater infectious pancreatic necrosis is largely explained by a major QTL. *Heredity* 105, 318-27.
- Houston R.D., Haley C.S., Hamilton A., Guy D.R., Tinch A.E., Taggart J.B., McAndrew B.J. & Bishop S.C. (2008) Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics* 178, 1109-15.
- Hua L.Z., Wu Y.Z., Bai F.F., William K.K., Feng Z.X., Liu M.J., Yao J.T., Zhang X. & Shao G.Q. (2014) Comparative analysis of mucosal immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* in Jingquhai porcine lean strain and DLY piglets. *Genetics and Molecular Research* 13, 5199-206.
- Hubner N., Yagil C. & Yagil Y. (2006) Novel integrative approaches to the identification of candidate genes in hypertension. *Hypertension* 47, 1-5.
- Hutt, F.B. (1958) Genetic resistance to disease in domestic animals. Comstock Publishers, Ithaca, NY.
- Inzana T.J. (1991) Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis* 11, 305-16.
- Imberechts H., De Greve H., Schlicker C., Bouchet H., Pohl P., Charlier G., Bertschinger H., Wild P., Van-Dekerckhove J., van Damme J. (1992) Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107 / 86 which causes oedema disease in pigs and nucleotide sequence of F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. *Infection and Immunity* 60, 1963-71.
- Jacobsen I., Hennig-Pauka I., Baltes N., Trost M. & Gerlach G.F. (2005) Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. *Infection and Immunity* 73, 226-34.
- Jacobsen M.J., Nielsen J.P. & Nielsen R. (1996) Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. *Veterinary Microbiology* 49, 159-68.
- Jacobsen, M.J. & Nielsen, J.P. (1995) Development and evaluation of a selective and indicative

- medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 47, 191-97.
- Janeway C.A. Jr & Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20, 197-216.
- Jaques M. (2004) Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 68, 81-5.
- Jacques M., Labrie J., St. Michael F., Cox A.D., Paradis M-A., Dick C.P., Klopfenstein C., Broes A., Fittipaldi N. & Gottschalk M. (2005) Isolation of an Atypical Strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 with a Truncated Lipopolysaccharide Outer Core and No O-Antigen. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 3522-25.
- Jensen T.K., Boye M., Hagedorn-Olsen T., Riising H.J. & Angen O. (1999) *Actinobacillus pleuropneumoniae* osteomyelitis in pigs demonstrated by fluorescent in situ hybridization, *Veterinary Pathology* 36, 258-61.
- Jirawattanapong P., Stockhofe-Zurwieden N., van Leengoed L., Wisselink H., Raymakers R., Cruijssen T., van der Peet-Schwering C., Nielen M. & van Nes A. (2008) Pleuritis in slaughter pigs: relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis. *Research in Veterinary Science* 88, 11-5.
- Johansson M., Ellegren H. & Andersson L. (1992) Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *Journal of Heredity* 83, 196-8.
- Jørgensen, C.B., Cicera S., Anderson S.I., Archibald A.L., Raudsepp T., Chowdhary B., Edfors-Lilja I., Andersson L. & Fredholm M. (2003) Linkage and comparative mapping of the locus controlling susceptibility towards *E. coli* F4ab/ac diarrhea in pigs. *Cytogenetic and Genome Research* 102, 157-62.
- Kallies A. (2008) Distinct regulation of effector and memory T-cell differentiation. *Immunology and Cell Biology* 86, 325-32.
- Kau A.L. & Korenblat P.E. (2014) Anti-interleukin 4 and 13 for asthma treatment in the era of endotypes. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 14, 570-5.
- Kadowaki H., Suzuki E., Kojima-Shibata C., Suzuki K., Okamura T., Onodera W., Shibata T. & Kano H. (2012) Selection for resistance to swine mycoplasmal pneumonia over 5 generations in Landrace pigs. *Livestock Science* 147, 20-6.
- Kahlisch D., Buettner F.F.R., Naim H.Y., Gerlach G.F. & the members of the FUGATO-consortium IRAS (2009) Glycoprotein analysis of porcine bronchoalveolar lavage fluid

- reveals potential biomarkers corresponding to resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Veterinary Research* 40, 60.
- Kaiser M.G., Deeb N. & Lamont S.J. (2002) Microsatellite markers linked to *Salmonella enterica* serovar enteritidis vaccineresponse in young F1 broiler-cross chicks. *Poultry Science* 8, 193-201.
- Karlskov-Mortensen P., Hu Z.L., Reecy J.M. & Fredholm M. (2008) A data resource of 838 porcine microsatellite sequences with repeat motifs of three to six bases. *Animal Genetics* 39, 85-6.
- Kirillov V., Siler J.T., Ramadass M., Ge L., Davis J., Grant G., Nathan S.D., Jarai G. & Trujillo G. (2015) Sustained activation of Toll-like Receptor 9 induces an invasive phenotype in lung fibroblasts: Possible Implications in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, epub ahead of print.
- Kirkpatrick B.W., Shi X., Shook G.E. & Collins M.T. (2011) Whole-Genome association analysis of susceptibility to paratuberculosis in holstein cattle. *Animal Genetics* 42, 149-60.
- Klitgaard K., Friis C., Angen Ø. & Boye M. (2010) Comparative profiling of the transcriptional response to iron restriction in six serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with different virulence potential. *BMC Genomics* 11, 698.
- Klitgaard K., Friis C., Jensen T.K., Angen Ø. & Boye M. (2012) Transcriptional Portrait of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during Acute Disease - Potential Strategies for Survival and Persistence in the Host. *PLoS ONE* 7, e35549.
- Komal J.P.S. & Mittal K.R. (1990b). Studies on the interaction of two different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Diseases* 13, 25-34.
- Kosambi D.D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* 12, 172-5.
- Kühn C., Reinhardt F. & Schwerin M. (2008) Marker assisted selection of heifers improved milk somatic cell count compared to selection on conventional pedigree breeding values. *Archiv Tierzucht* 51, 1.
- Kwok P.Y., Deng Q., Zakeri H., Taylor S.L. & Nickerson D.A. (1996) Increasing the information content of STS-based genome maps: Identifying polymorphisms in mapped STSs. *Genomics* 31, 123-6.

- Lacey C., Wilkie B.N., Kennedy B.W. & Mallard B.A. (1989) Genetic and other effects on bacterial phagocytosis and killing by cultured peripheral blood monocytes of SLA-defined miniature pigs. *Animal Genetics* 20, 371-82.
- Landegren U., Nilsson M. & Kwok P. Y. (1998) Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Research* 8, 769-76.
- Lander E.S. & Botstein D. (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-99.
- Langford P.R., Loynds B.M. & Kroll J.S. (1996) Cloning and molecular characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 64, 5035-41.
- Lantier I., Moreno C.R., Berthon P., Salle G., Pitel F., Schibler L., Gautier-Bouchardon A.V., Boivin R., Weisbecker J.L., François D., Bouix J., Crihiu E.P., Elsen J.M. & Lantier F. (2012) Quantitative trait loci for resistance to infection in sheep using a live *Salmonella Abortusovis* vaccine. *Animal Genetics* 43, 632-5.
- Leach R.J., Craigmile S.C., Knott S.A., Williams J.L. & Glass E.J. (2010) Quantitative trait loci for variation in immune response to a Foot-and-Mouth Disease virus peptide. *BMC Genetics* 11, 107.
- Leiner G., Franz B., Strutzberg K. & Gerald G.F. (1999) A novel enzymelinked immunosorbent assay using the recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxII antigen for diagnosis of pleuropneumonia in pig herds. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6, 630-632.
- Li B.W. & Hendriks R.W. (2013) Group 2 innate lymphoid cells in lung inflammation. *Immunology* 140, 281-7.
- Li Y., Sun Y., Xing F., Kang L., Wang P., Wang L., Liu H., Li Y. & Jiang Y. (2014) Identification of a single nucleotide promoter polymorphism regulating the transcription of ubiquitin specific protease 18 gene related to the resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 162, 65-71.
- Li L., Sun C., Yang F., Yang S., Feng X., Gu J., Han W., Langford P.R. & Lei L. (2013) identification of proteins of *Propionibacterium acnes* for use as vaccine candidates to prevent infection by the pig pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine* 31, 5269-75.

- Li Y., Yang S.L., Tang Z.L., Cui W.T., Mu Y.L., Chu M.X., Zhao S.H., Wu Z.F., Li K. & Peng K.M. (2010) Expression and SNP association analysis of porcine FLXL4 gene. *Molecular Biology Reports* 37, 579-85.
- Lillico S.G., Proudfoot C., Carlson D.F., Stverakova D., Neil C., Blain C., King T.J., Ritchie W.A., Tan W., Mileham A.J., McLaren D.G., Fahrenkrug S.C. & Whitelaw C.B. (2013) Live pigs produced from genome edited zygotes. *Scientific Reports* 3, 2847.
- Lin C.J., Lin H.J., Chen T.H., Hsu Y.A., Liu C.S., Hwang G.Y. & Wan L. (2015) *Polygonum cuspidatum* and its active components inhibit replication of the Influenza Virus through Toll-like Receptor 9 induced interferon beta expression. *PLoS One* 10, e0117602.
- Lipkin E., Mosig M.O., Darvasi A., Ezra E., Shalom A., Friedmann A. & Soller M. (1998) Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective milk DNA pooling using dinucleotide microsatellite markers: analysis of milk protein percentage. *Genetics* 149, 1557-67.
- Litt M. & Luty J.A. (1989) A Hypervariable Microsatellite Revealed by *In Vitro* Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. *The American Journal of Human Genetics* 44, 397-401.
- Liu J.L., Chen X., Tan C., Guo Y., Chen Y., Fu S.L., Bei, W. & Chen, H. (2009) *In vivo* induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 137, 282-9.
- Liu P.T., Stenger S., Huiying L., Wenzel L., Tan B.H., Krutzik S.R., Ochoa M.T., Schaubert J., Wu K., Meinken C., Kamen D.L., Wagner M., Bals R., Steinmeyer A., Zügel U., Gallo R.L., Eisenberg D., Hewison M., Hollis B.W., Adams J.S., Bloom B.R. & Modlin R.L. (2006) Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science Magazine* 311, 1770-3.
- Liu Y., Lu X., Luo Y.R., Zhou J.P., Liu X.Y., Liu J.F., Ding X.D. & Zhang Q. (2011) Molecular characterization and association analysis of porcine interferon regulatory factor 1 gene. *Molecular Biology Reports* 38, 1901-7.
- Lone A.G., Deslandes V., Nash J.H.E., Jacques M. & MacInnes J.I. (2009a) Modulation of gene expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposed to bronchoalveolar fluid. *PLoS One* 4, e6139.
- Lone A.G., Deslandes V., Nash J.H.E., Jacques M. & MacInnes J.I. (2009b) malT knockout mutation invokes a stringent type gene-expression profile in *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae in bronchoalveolar fluid, *BMC Microbiology* 9, 195.
- Lopez-Soria S., Segales J., Nofrarias M., Calsamiglia M., Ramirez H., Minguez A., Serrano J.M., Marin O. & Callen A. (2004) Genetic influence on the expression of PCV disease. *Veterinary Record* 155, 504.
- Lu X., Fu W.-X., Luo Y.-R., Ding X.-D., Zhou J.-P., Liu Y., Liu J.-F. & Zhang Q. (2012) Genome-wide association study for T lymphocyte subpopulations in swine. *BMC Genomics* 13, 488.
- Lu X., Gong Y., Liu J., Wang Z., Hu F, et al. (2011) Mapping quantitative trait loci for cytokines in the pig. *Animal Genetics* 42, 1-5.
- Lu X., Liu J., Fu W., Zhou J., Luo Y., Ding X., Liu Y. & Zhang Q. (2013) Genome-wide association study for cytokines and immunoglobulin G in swine. *PLoS One* 8, e74846.
- Lund M.S., Guldbbrandtsen B., Buitenhuis A.J., Thomsen B. & Bendixen C. (2008) Detection of Quantitative Trait Loci in Danish Holstein Cattle Affecting Clinical Mastitis, Somatic Cell Score, Udder Conformation Traits, and Assessment of Associated Effects on Milk Yield. *Journal of Dairy Science* 91, 4028-36.
- Lunney J.K. (2010) Viral diseases in pigs. In: *Breeding for disease resistance in farm animals*, 3rd edn. . CAB International, Wallingford, UK.
- Lunney J. K. & Murrell K.D. (1988) Immunogenetic analysis of *Trichinella spiralis* infections in swine. *Veterinary Parasitology* 29, 179-193.
- Lynch, M. & Walsh, B. (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Maas A., Meens J., Baltes N., Hennig-Pauka I. & Gerlach G.F. (2006) Development of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vaccine* 24, 7226-37.
- Madden K.B., Moeller R.F., Douglass L.W., Goldman T. & Lunney J.K. (1993) *Trichinella spiralis*: genetic basis and kinetics of the anti-encysted muscle larval response in miniature swine. *Experimental Parasitology* 77, 23-35.
- Madden K.B., Murrell K.D. & Lunney J.K. (1990) *Trichinella spiralis*: major histocompatibility complex-associated elimination of encysted muscle larvae in swine. *Experimental Parasitology* 70, 443-51.
- Maes D., Chiers K., Haesebrouck F., Laevens H., Verdonck M. & de Kruif A. (2001) Herd factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars

- 2, 3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research* 32, 409-19.
- Maglott D., Ostell J., Pruitt K.D. & Tatusova T. (2005) Entrez-Gene: gene-centered information at ncbi. *Nucleic Acids Research* 1; 33. (Database issue):D54-8.
- Mallard B.A., Wilkie B.N., Kennedy B.W., Gibson J. & Quinton M. (1998) Immune responsiveness in swine: eight generations of selection for high and low immune response in Yorkshire pigs. *Proceedings of 6th World Congress on Genetics Applied to livestock Production, Armidale*, 1-8.
- Mallard B.A., Wilkie B.N., Kennedy B.W. & Quinton M. (1992) Use of estimated breeding values in a selection index to breed Yorkshire pigs for high and low immune and innate resistance factors. *Animal Biotechnology* 3, 257-80.
- Martins C.L., Lawman M. J., Scholl T., Mebus C.A. & Lunney J.K. (1993) African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Archives of Virology* 129, 211-25.
- Masle S. (2007) Multistage QTL mapping strategy in an advanced backcross cattle population. *Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilian-Universität München, Deutschland*.
- McClure M.C., Morsci N.S., Schnabel R.D., Kim J.W., Yao P., Rolf M.M., McKay S.D., Gregg S.J., Chapple R.H., Northcutt S.L. & Taylor J.F. (2010) A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. *Animal Genetics* 41, 597-607.
- McPeck M.S. (2000) From mouse to human: Fine mapping of quantitative trait loci in a model organism. *Proceedings of the National Academy of Science* 97, 12389-90.
- Meijerink E., Fries R., Vögeli P., Masabanda J., Wigger G., Stricker C., Neuenschwander S., Bertschinger H.U., Stranziger G. (1997) Two alpha (1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor(S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. *Mammalian Genome* 8, 736-41.
- Mengeling W.L. & Cutlip R.C. (1976) Pathogenicity of field isolants of hemagglutinating encephalomyelitis virus for neonatal pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 168, 236-9.
- Mikawa S., Akita T., Hisamatsu N., Inage Y., Ito Y., Kobayashi E., Kusumoto H., Matsumoto T., Mikami H., Minezawa M., Miyake M., Shimanuki S., Sugiyama C., Uchida Y., Wada Y., Yanai S. & Yasue H (1999) A linkage map of 243 DNA markers in an intercross of Göttingen miniature and Meishan pigs. *Animal Genetics* 30, 407-7.

- Miteva L. & Stanilova S. (2008). The combined effect of interleukin (IL)-10 and IL-12 polymorphisms on induced cytokine production. *Human Immunology* 69, 562-6.
- Miles C. & Wayne M. (2008) Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education* 1(1).
- Moeck G.S. & Coulton J.W. (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Molecular Microbiology* 28, 675-81.
- Moen T., Baranski A., Sonesson A.K. & Kjoeglum S. (2009) Confirmation and fine mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) population level association between markers and trait. *BMC Genomics* 10, 368.
- Moreno C.R., Moazami-Goudarzi K., Briand S., Robert-Granié C., Weisbecker J.L., Laurent P., Cribiu E.P., Haley C.S., Andréoletti O. & Bishop S. (2010). Mapping of QTL affecting classical scrapie incubation time in a population comprising several generations of scrapie infected sheep. *The Journal of General Virology* 91, 575-9.
- Müller M., Brenig B., Winnacker E.L. & Brem G. (1992) Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection. *Gene* 121, 263-70.
- Mullis K. B. & Faloona F. (1987) Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-50.
- Munk K. (2010) Taschenlehrbuch Biologie, Genetik. Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, Deutschland.
- Murray V., Monachwin C., England P.R. (1993) The determination of the sequences in the shadow bands of a dinocluetide repeat PCR. *Nucleic Acids Research* 21, 2395-98.
- Murray M., Stear M.J., Trail J.C.M., Diteran G.D., Agyemang K. & Dwinger R.H. (2000) Trypanosomiasis in cattle. Prospects for control. In: Axford, R.F.E., Bishop, S.C., Nicholas, F.W., Owen, J.B. (Eds.), *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. CABI, Wallingford, 203-23.
- Nakajima E., Morozumi T., Tsukamoto K., Watanabe T., Plastow G. & Mitsuhashi T. (2007) A naturally occurring variant of porcine Mx1 associated with increased susceptibility to influenza virus *in vitro*. *Biochemical Genetics* 45, 11-24.
- Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E. & White R. (1987) Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science* 235, 1616-22.

- 
- Negrete-Abascal E., Tenorio V.R., Serrano J.J., Garcia C. & de la Garza M. (1994) Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Canadian Journal of Veterinary Research* 58, 83-6.
- Nejsum P., Roepstorff A., Jorgensen C.B., Fredholm M. & Thamsborg S.M. (2006) Breeding for parasite resistance in pigs – a future option? *Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark* 2, 410.
- Nielsen R. (1995) Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 2 in porcine colostrum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay specific for serotype 2. *Veterinary Microbiology* 43, 277-281.
- Nishikori M. (2005) Classical and Alternative NF- $\kappa$ B Activation Pathways and their Roles in Lymphoid Malignancies. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 45, 15-24.
- Nkrumah J. D., Sherman E. L., Li C., Marques E., Crews D. H., Bartusiak R., Murdoch B., Wang Z., Basarab J. A. & Moore S. S. (2007) Primary genome scan to identify putative quantitative trait loci for feedlot growth rate, feed intake, and feed efficiency of beef cattle. *Journal of Animal Science* 85, 3170-81.
- Noyes E.P., Feeney D. & Pijoan C. (1990) Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197, 1025-9.
- Oberbauer A.M., Belanger J.M., Grossman D.I., Regan K.R. & Famula T.R. (2010) Genome-wide linkage scan for loci associated with epilepsy in Belgian shepherd dogs. *BMC Genetics* 11, 35.
- Ogutu J.O., Schulz-Streeck T. & Piepho H.P. (2012) Genomic selection using regularized linear regression models: ridge expression, lasso, elastic net and their extensions. *BMC Proceedings* 6, 10.
- Okamura T., Onodera W., Tayama T., Kadowaki H., Kojima-Shibata C., Suzuki E., Uemoto Y., Mikawa S., Hayashi T., Awata T., Fujishima-Kanaya N., Mikawa A., Uenishi H. & Suzuki K. (2012) A genome wide scan for quantitative trait loci affecting respiratory disease and immune capacity in Landrace pigs. *Animal Genetics* 43, 721-9.
- Olander H.J. (1963) Septicemic disease in swine and its causative agent, *Haemophilus paraahaemolyticus*. PhD Thesis, University of California, Davis, California, USA.
- Olejniczak M. & Krzyzosiak W.J. (2006) Genotyping of simple sequence repeats-factors

- implicated in shadow band generation revisited. *Electrophoresis* 27, 3724-34.
- Ombrello M.J., Remmers E.F., Sun G., Freeman A.F., Datta S., Torabi-Parizi P., Subramanian N., Bunney T.D., Baxendale R.W., Martins M.S., Romberg N., Komarow H., Aksentijevich I., Kim H.S., Ho J., Cruse G., Jung M.-Y., Gilfillan A.M., Metcalfe D.D., Nelson C., O'Brien M., Wisch L., Stone K., Douek D.C., Gandhi C., Wanderer A.A., Lee H., Nelson S.F., Shianna K.V., Cirulli E.T., Goldstein D.B., Long E.O., Moir S., Meffre E., Holland S.M., Kastner D.L., Katan M., Hoffman H.M. & Milner J.D. (2012) Cold Urticaria, Immunodeficiency, and Autoimmunity Related to PLCG2 Deletions. *The New England Journal of Medicine* 366, 330-8.
- O'Neill C., Jones S.-C.P., Bossé J.T., Watson C.M., Williamson S.M., Rycroft A.N., Kroll J.S., Hartley H.M. & Langford P.R. (2010) Population-based analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIVA for use as a DIVA antigen. *Vaccine* 28, 4871-74.
- Opriessnig T., Fenaux M., Thomas P., Hoogland M. J., Rothschild M. F., Meng X.J. & Halbur P.G. (2006) Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to Porcine Circovirus Type-2-associated disease and lesions. *Veterinary Pathology* 43, 281-93.
- Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal M., Rothschild M., Kuhar D., Lunney J.K., Juhan N.M., Meng X.J. & Halbur P.G. (2009) Differences in severity of porcine circovirus type 2 (PCV2)-induced lesions and disease between Landrace and Piétrain pigs. *Journal of Animal Science* 87, 1582-90.
- O'Shea J.J., Holland S.M. & Staudt L.M. (2013) JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency and cancer. *The New England Journal of Medicine* 368, 161-70.
- Ott J. (1991) Analysis of human genetic linkage. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Oura C.A.L., Powell E., Anderson E. & Parkhouse R.M.E. (1998) The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *Journal of General Virology* 79, 1439-43.
- Ozaki A., Sakamoto T., Khoo S., Nakamura K., Coimbra M.R., Akutsu T. & Okamoto N. (2001) Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Genetics and Genomics* 265, 23-31.
- Palm M., Garigliany M.M., Cornet F. & Desmecht D. (2010) Interferon-induced *Sus scrofa* Mx1 blocks endocytic transport of incoming influenza A virus particles. *Veterinary Research* 41, 29.

- Palm M., Leroy M., Thomas A., Linden A. & Desmecht D. (2007) Differential anti-influenza activity among allelic variants at the *Sus scrofa* Mx1 locus. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 27, 147-55.
- Paradis S.E., Dubreuil D., Rioux S., Gottschalk M. & Jacques M. (1994) High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infection and Immunity* 62, 3311-19.
- Park C., Ha Y., Kim S., Chae C. & Ryu D.Y. (2009) construction and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 mutant lacking the Apx toxin secretion protein genes *apxIIIB* and *apxIIID*. *Journal of Veterinary Medical Science* 71, 1317-23.
- Pastoret S., Ameels H., Bossiroy F., Decreux A., De Longueville F., Thomas A. & Desmecht D. (2012) Detection of disease resistance and susceptibility alleles in pigs using oligonucleotide microarray hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 479-88.
- Pattison J.H., Howell D.G. & Elliot J. (1957). A haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *Journal of Comparative Pathology* 67, 320-30.
- Pedersen L.E., Jungersen G., Sorensen M.R., Ho C.S. & Vadkær D.F. (2014) Swine Leukocyte Antigen (SLA) class I allele typing of Danish swine herds and identification of commonly occurring haplotypes using sequence specific low and high resolution primers. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 62, 108-16.
- Perry M.B., Altman E., Brisson J.-R., Beynon L.M. & Richards J.C. (1990). Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Serodiagnosis and Immunotherapy of Infectious Diseases* 4, 299-308.
- Petiot A. & Anderson Dear D.V. (1997) Two new polymorphic porcine microsatellites, S0533 and S0534. *Animal Genetics* 28, 458.
- Petry D.B., Lunney J., Boyd P., Kuhar D., Blankenship E. & Johnson R.K. (2007) Differential immunity in pigs with high and low response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Journal of Animal Science* 85, 2075-92.
- Pohl S., Bertschinger H.U., Frederiksen W. & Mannheim W. (1983). Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*

- comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33, 510-4.
- Pompanon F., Bonin A., Bellemain E. & Taberlet P. (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6, 847-59.
- Preston J.M. & Allonby E.W. (1979) The influence of breed on the susceptibility of sheep to *Haemonchus contortus* infection. *Research in Veterinary Science* 26, 134-9.
- Pryce J.E., Wales W.J., de Haas Y., Veerkamp R.F. & Hayes B.J. (2014) Genomic selection for feed efficiency in dairy cattle. *Animal* 8, 1-10.
- Przytulski T. & Porzeczowska D. (1980) Studies on genetic resistance to leptospirosis in pigs. *British Veterinary Journal* 136, 25-32.
- QIAGEN Multiplex PCR Handbook 02/2008 (2008) [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)
- Qiu X.T., Li Y.H., Li H., Yu Y. & Zhang Q. (2007) Molecular cloning, mapping, and tissue expression of the porcine cluster of differentiation 14 (CD14) gene. *Biochemical Genetics* 45, 459-68.
- Ramjeet M., Deslandes V., St Michael F., Cox A.D., Kobisch M., Gottschalk M. & Jacques M. (2005) Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *The Journal of Biological Chemistry*. 280, 39104-14.
- Ramjeet M., Cox A.D., Hancock M.A., Mourez M., Labrie J., Gottschalk M. & Jacques M. (2008) Mutation in the LPS outer core biosynthesis gene, *galU*, affects LPS interaction with the RTX toxins ApxI and ApxII and cytolytic activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Molecular Microbiology* 70, 221-35.
- Rampoldi A., Jacobsen M.J., Bertschinger H.U., Joller D., Burgi E., Vögeli P., Andersson L., Archibald A.L., Fredholm M., Jørgensen C.B. & Neuenschwander S. (2011) The receptor locus for *Escherichia coli* F4ab/F4ac in the pig maps distal to the MUC4-LMLN region. *Mammalian Genome* 22, 122-9.
- Rechav Y., Dauth J. & Els D. A. (1990) Resistance of Brahman and Simmentaler cattle to Southern African ticks. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 57, 7-12.
- Reheman A., Gross P., Yang H., Chen P., Allen D., Leytin V., Freedman J. & Ni H. (2005) Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3, 875-83.
- Reiner G. (2003) Evaluierung und Nutzung der natürlichen Krankheitsresistenz beim Schwein –

- aktueller Stand und Möglichkeiten. Tierärztliche Praxis 31, 151-7.
- Reiner G. (2009) Investigations on genetic disease resistance in swine - a contribution to the reduction of pain, suffering and damage in farm animals. Applied Animal Behaviour Science 118, 217-21.
- Reiner G., Bertsch N., Hoeltig D., Selke M., Willems H., Gerlach G.F., Tuemmler B., Probst I., Herwig R., Drungowski M. & Waldmann K.H. (2014a) Identification of QTL affecting resistance/susceptibility to acute *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. Mammalian Genome 25, 180-91.
- Reiner, G., Clemens, N., Lohner, E. & Willems, H. (2010) SNPs in the porcine GOT1 gene improve a QTL for serum aspartate aminotransferase activity on SSC14. Animal Genetics 41, 319-23.
- Reiner G., Dreher F., Drungowski M., Hoeltig D., Bertsch N., Selke M., Wilems H., Gerlach G.F., Tuemmler B., Waldmann K.H. & Herwig R. (2014b) Pathway deregulation and expression QTLs in response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. Mammalian Genome 25, 600-17.
- Reiner G., Eckert J., Peischl T., Bochert S., Jäkel T., Mackenstedt U., Joachim A., Dausgchies A., Geldermann H. (2002b) Variation in clinical and parasitological traits in Pietrain and Meishan pigs infected with *Sarcocystis miescheriana*. Veterinary Parasitology 106, 99-113.
- Reiner G., Fischer R., Hepp S., Berge T., Köhler F. & Willems H. (2008) Quantitative trait loci for white blood cell numbers in swine. Animal Genetics 39, 163-8.
- Reiner G., Kliemt D., Willems H., Berge T., Fischer R., Köhler F., Hepp S., Hertrampf B., Dausgchies A., Geldermann H., Mackenstedt U. & Zahner H. (2007) Mapping of quantitative trait loci affecting resistance/susceptibility to *Sarcocystis miescheriana* in swine. Genomics 89, 638-46.
- Reiner G., Melchinger E., Kramarova M., Pfaff E., Büttner M., Saalmüller A. & Geldermann H. (2002a) Detection of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to the *Pseudorabies* Virus in swine. Journal of General Virology 83, 167-72.
- Reiner G. & Willems H. (2010) MicroRNAs (miRNAs): zukunftssträngige Biomarker für die Krankheitsdiagnostik beim Schwein? Berlin Münchener Tierärztliche Wochenschrift 124, 102-7.
- Reiner G., Willems H., Pesch S. & Ohlinger V.F. (2010) Variation in resistance to the Porcine

- Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in Pietrain and Miniature pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 127, 100-6.
- Ren Y.W., Zhang Y.Y., Affara N.A., Sargent C.A., Yang L.G., Zhao J.L., Fang L.R., Wu J.J., Fang R., Tong Q., Xiao J., Li J.L., Jiang Y.B., Chen H.C. & Zhang S.J. (2012) The polymorphism analysis of CD169 and CD163 related with the risk of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Molecular Biology Reports* 39, 9903-9.
- Rioux S., Galarneau C., Harel J., Kobisch M., Frey J., Gottschalk M. & Jacques M. (2000) Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microbial Pathogenesis* 28, 279-89.
- Riquet J., Milan D., Woloszyn N., Schmitz A., Pitel F., Frelat G. & Gellin J (1995) A linkage map with microsatellites isolated from swine flow-sorted chromosome 11. *Mammalian Genome* 6, 623-8.
- Robic A., Dalens M., Woloszyn N., Milan D., Riquet J. & Gellin J. (1994) Isolation of 28 new porcine microsatellites revealing polymorphism. *Mammalian Genome* 5, 58-3.
- Robic A., Milan D., Woloszyn N., Riquet J., Yerle M., Nagel M., Bonnet M., Pinton P., Dalens M. & Gellin J. (1997) Contribution to the physically anchored linkage map of the pig. *Animal Genetics* 28, 94-102.
- Robic A., Parrou J.L., Yerle M., Goureau A., Dalens M., Milan D. & Gellin J (1995) Pig microsatellites isolated from cosmids revealing polymorphism and localized on chromosomes. *Animal Genetics* 26, 1-6.
- Rodriguez-Zas S.L., Southey B.R., Heyen D.W. & Lewin H.A. (2002) Interval and composite interval mapping of somatic cell score, yield, and components of milk in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85, 3081-91.
- Rogers G.L., Suzuki M., Zolotukhin I., Markusic D.M., Morel L.M., Lee B., Ertl H.C. & Herzog R.W. (2015) Unique roles of TLR9- and Myd88-dependent and independent pathways in adaptive immune responses to AAV-mediated gene transfer. *Journal of Innate Immunity*, epub ahead of print.
- Rohrer G.A., Alexander J.W., Keele J.W., Smith T.P. & Beattie C.W. (1994) A microsatellite linkage map on the porcine genome. *Genetics* 136, 231-45.
- Rohrer G.A., Alexander L.J., Hu Z., Smith T.P., Keele J.W. & Beattie C.W. (1996) A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research* 6, 371-91.
- Rohrer G.A., Fahrenkrug S.C., Nonneman D. & Warren W.C. (2002) Mapping microsatellite

- markers identified in porcine EST sequences. *Animal Genetics* 33, 372-6.
- Rohrer G.A., Stone R.T., Wang Z. & Troyer D (1998) Rapid communication: identification of two microsatellite loci that map to porcine chromosome 3. *Journal of Animal Science* 76, 1503-4.
- Rohrer G.A., Vögeli P., Stranzinger G., Alexander L.J. & Beattie C.W. (1997) Mapping 28 erythrocyte antigen, plasma protein and enzyme polymorphisms using an efficient genomic scan of the porcine genome. *Animal Genetics* 28, 323-30.
- Rothschild M.F., Chen H.L., Christian L.L., Lie W.R., Venier L., Cooper M., Briggs C. & Warner C.M. (1984a) Breed and swine lymphocyte antigen haplotype differences in agglutination titers following vaccination with *B. bronchiseptica*. *Journal of Animal Science* 59, 643-9.
- Rothschild M.F., Hill H.T., Christian L.L. & Warner C.M. (1984b) Genetic differences in serum-neutralisation titers of pigs after vaccination with *pseudorabies* modified live-virus vaccine. *American Journal of Veterinary Research* 45, 1216-8.
- Rothschild M.F., Jacobson C., Vaske D., Tuggle C., Wang L., Short T., Eckardt G., Sasaki S., Vincent A., McLaren D., Southwood O., Van der Steen H., Mileham A. & Plastow G. (1996) The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Genetics* 93, 201-5.
- Rowland R.R., Lunney J., Dekkers J. (2012) Control of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) through genetic improvements in disease resistance and tolerance. *Frontiers in Genetics* 14, 260.
- Ruyter D., Johansson M., Groenen M. & Andersson L. (1994) A porcine polymorphic microsatellite locus (S0098). *Animal Genetics* 25, 198.
- Rycroft A.N. & Garside L.H. (2000) *Actinobacillus* Species and their Role in Animal Disease. *The Veterinary Journal* 159, 18-36.
- Saar Ray M., Moskovich O., Iosefson O. & Fishelson Z. (2014) Mortalin/GRP75 binds to complement C9 and plays a role in resistance to complement-dependent cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 15014-22.
- Safaei S, Pourpak Z, Moin M & Houshmand M. (2011) IL7R and RAG1/2 genes mutations/polymorphisms in patients with scid. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 10, 129-32.
- Sahana G., Guldbrandtsen B., Bendixen C. & Lund M.S. (2010) Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. *Animal Genetics* 41, 579-88.

- Sanz G., Pérez E., Jiménez-Marín A., Mompert F., Morera L., Barbancho M., Llanes D. & Garrido J.J. (2007) Molecular cloning, chromosomal location, and expression analysis of porcine CD14. *Developmental and Comparative Immunology* 31, 738-47.
- Schadt E. E., Monks S.A., Drake T.A., Lusisk A.J., Chek N., Colinayok V., Ruff T.G., Milligan S.B., Lamb J.R., Cavet G., Linsley P.S., Mao M., Stoughton R.B. & Friend S.H. (2003) Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature* 422, 297-302.
- Schaller A., Kuhn R., Kuhnert P., Nicolet J., Anderson T.J., MacInnes J.I., Segers R.P. & Frey J. (1999) Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 145, 2105-16.
- Schlotterer C. & Harr B. (2004) Microsatellite Instability. *Encyclopedia of Life Science*, Nature Publishing Group, DOI: 10.1038/npg.els.0000840.
- Schneberger D., Lewis D., Caldwell S. & Singh B. (2011) Expression of toll-like receptor 9 in lungs of pigs, dogs and cattle. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 92, 1-7.
- Schrooten C., Bink M.C.A.M. & Bovenhuis H. (2004) Whole genome scan to detect chromosomal regions affecting multiple traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 87, 3550-60.
- Schulmann N.F., Sahana G., Iso-Turu T., Andersson-Eklund L., Viitala S.M., Värvi S., Viinalass H. & Vilkki J.H. (2009) Fine mapping of quantitative trait loci for mastitis resistance on bovine chromosome 11. *Animal Genetics* 40, 509-15.
- Sciutto E., Martinez J.J., Huerta M., Avila R., Fragoso G., Villalobos N., de Aluja A., Larralde C. (2003) Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Veterinary Parasitology* 116, 223-9.
- Seaton G., Haley C. S., Knott S. A., Kearsley M. & Visscher P. M. (2002) QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* 18, 339-40.
- Seaton G., Hernandez J., Grunchev J.A., White I., Allen J., De Koning D.J., Wei W., Berry D., Haley C. & Knott S. (2006) GridQTL: A Grid Portal for QTL Mapping of Compute Intensive Datasets. *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, August 13-18, 2006. Belo Horizonte, Brazil.
- Selbitz H.J. (2007) Bakterielle Krankheiten der Tiere. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions-*

- und Seuchenlehre. A. Mayr und M. Rolle, Enke Verlag, Stuttgart.
- Serebrin S., Rosendal S., Valdivieso-Garcia A. & Little P.B. (1991) Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Research in Veterinary Science* 50, 18-22.
- Seyffert W. (2003) *Lehrbuch der Genetik*, 2.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag/Gustav Fischer Verlag, Germany.
- Sever-Chroneos Z., Murthy A., Davis J., Florence J.M., Kurdowska A., Krupa A., Tichelaar J.W., White M.R., Hartshorn K.L., Kobzik L., Whitsett J.A. & Chroneos Z.C. (2011) GM-CSF modulates pulmonary resistance to influenza A infection. *Antiviral Research* 92, 319-28.
- Shakarji L., Mikael L.G., Srikumar R., Kobisch M., Coulton J.W. & Jacques M. (2006) FhuA and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 391-6.
- Shao M., Wang Y., Wang C., Guo Y., Peng Y., Liu J., Li G., Liu H. & Liu S. (2010) Evaluation of multicomponent recombinant vaccines against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52, 52.
- Shimazu T., Borjigin L., Katayama Y., Li M., Satoh T., Watanabe K., Kitazawa H., Roh S.G., Aso H., Kazuo K., Suda Y., Sakuma A., Nakajo M. & Suzuki K. (2014) Genetic selection for resistance to mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) in the Landrace line influenced the expression of soluble factors in blood after MPS vaccine sensitization. *Animal Science Journal* 85, 365-73.
- Shin M.K., Kang M.L., Jung M.H., Cha S.B., Lee W.J., Kim J.M., Kim D.H. & Yoo H.S. (2013) Induction of protective immune responses against challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by oral administration with *Saccharomyces cerevisiae* expressing Apx toxins in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 151, 132-9.
- Shinkai H., Matsumoto T., Toki D., Okumura N., Terada K. & Uenishi H. (2015) Porcine NOD1 polymorphisms with impaired ligand recognition and their distribution in pig populations. *Molecular Immunology* 63, 305-11.
- Shinkai H., Muneta Y., Suzuki K., Eguchi-Ogawa T., Awata T. & Uenishi H. (2006) Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: Complete sequencing of genomic region and expression analysis. *Molecular Immunology* 43, 1474-80.
- Shinkai H., Tanaka M., Morozumi T., Eguchi-Ogawa T., Awata T. & Uenishi H. (2006) Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1

- (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6 genes. *Immunogenetics* 58, 324-30.
- Shope R.E. (1964). Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *Journal of Experimental Medicine* 119, 357-68.
- Shope R.E., White D.C. & Leidy G. (1964). Porcine contagious pleuropneumonia. II. Studies of the pathogenicity of the etiological agent *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Journal of Experimental Medicine* 119, 369-75.
- Short T.H., Rothschild M.F., Southwood O.I., McLaren D.G., de Vries A., Van der Steen H., Eckardt G.R., Tuggle C.K., Helm J., Vaske D.A., Mileham A.J. & Plastow G.S. (1997). Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *Journal of Animal Science* 75, 3138-42.
- Sjölund S. & Wallgren P. (2010) Field experience with two different vaccination strategies aiming to control infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a fattening pig herd. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52, 23.
- Skallerup P., Nejsum P., Jørgensen C.B., Göring H.H., Karlskov-Mortensen P., Archibald A.L., Fredholm M. & Thamsborg S.M. (2012) Detection of a quantitative trait locus associated with resistance to *Ascaris suum* infection in pigs. *International Journal for Parasitology* 42, 383-91.
- Skovgaard K., Mortensen S., Boye M., Hedegaard J. & Heegaard P.M.H. (2010) Hepatic gene expression changes in pigs experimentally infected with the lung pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* as analysed with an innate immunity focused microarray. *Innate Immunity* 16, 343.
- Slots J. & Listgarten M. A. (1988), *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 15, 85-93.
- Smith T.P., Rohrer G.A., Alexander L.J., Troyer D.L., Kirby-Dobbels K.R., Janzen M.A., Cornwell D.L., Louis C.F., Schook L.B. & Beattie CW (1995) Directed integration of the physical and genetic linkage maps of swine chromosome 7 reveals that the SLA spans the centromere. *Genome Research* 5, 259-71.
- Sonstegard T.S., Rohrer G.A. & Smith T.P. (1998) Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Animal Genetics* 29, 19-22.
- Sørensen K.K., Gregersen V.R., Christensen O.F., Velander I.H. & Bendixen C. (2011) Genomic regions associated with ventro-cranial chronic pleuritis in pig. *Animal*

- Breeding and Genetics 128, 314-8.
- Soussi-Gounni A., Kontolemos M. & Hamid Q. (2001) Role of IL-9 in the pathophysiology of allergic diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107, 575-82.
- Spickett A. M., De Klerk D., Enslin C. B. & Scholtz M. M. (1989) Resistance of Nguni, Bonsmara and Hereford cattle to ticks in a bushveld region of South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 56, 245-50.
- Stachowiak M., Cieslak J., Skorczyk A., Nowakowska J., Szczerbal I., Szydlowski M. & Switonski M.J. (2009) The pig CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) gene and association of its microsatellite polymorphism with production traits. *Animal Breeding Genetics* 126, 37-42.
- Standiford L.R., Standiford T.J., Newstead M.J., Zeng X., Ballinger M.N., Kovach M.A., Reka A.K. & Bhan U. (2012) TLR4-dependant GM-CSF protects against lung injury in Gram-negative bacterial pneumonia. *American journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 302, 447-54.
- Stanke F., Tümmler B. & Becker T. (2006a) Genetic modifiers in cystic fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 354, 88-90.
- Stanke F., Becker T., Cuppens H., Kumar V., Cassiman J.J., Jansen S., Radojkovic D., Siebert B., Yarden J., Ussery D.W., Wienker T.F. & Tümmler B. (2006b): The TNF- $\alpha$  receptor TNFRSF1A and genes encoding the amiloride-sensitive sodium channel ENaC as modulators in cystic fibrosis. *Human Genetics* 119, 331-43.
- Stärk K.D.C. (2000) Epidemiological Investigation of the Influence of Environmental Risk Factors on Respiratory Diseases in Swine - A Literature Review. *The Veterinary Journal* 159, 37-56.
- Stear M. J. & Wakelin, D. (1998) Genetic resistance to parasitic infection. *Scientific and Technical Review Office of International Epizootics* 17, 143-53.
- Steinwede K., Tempelhof O., Bolte K., Maus R., Bohling J., Ueberberg B., Länger F., Christman J.W., Paton J.C., Ask K., Maharaj S., Kolb M., Gauldie J., Welte T. & Maus U.A. (2011) Local delivery of GM-CSF protects mice from lethal pneumococcal pneumonia. *Journal of Immunology* 187, 5346-56.
- Straw B.E., Tuovinen V. & Bigras-Poulin M. (1989) Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195, 1702-6.
- Su Y.C., Jalalvand F., Mörgelin M., Blom A.M., Singh B. & Riesbeck K. (2013)

- Haemophilus influenzae acquires vitronectin via the ubiquitous Protein F to subvert host innate immunity. *Molecular Microbiology* 87, 1245-66.
- Tai-Nagara I., Matsuoka S., Ariga H. & Suda T. (2014) Mortalin and DJ-1 coordinately regulate hematopoietic stem cell function through the control of oxidative stress. *Blood* 123, 41-50.
- Takeda K. & Akira S. (2004) TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* 16, 3.
- Takeuchi O., Takeda K., Hoshino K., Adachi O., Ogawa T. & Akira S. (2000) Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88- dependent signaling cascades. *International Immunology* 12, 113-7.
- Tarigan S., Slocombe R.F., Browning G.F. & Kimpton W. (1994), Functional and structural changes of porcine alveolar macrophages induced by sublytic doses of a heat-labile, hemolytic, cytotoxic substance produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research* 55, 1548-57.
- Tautz D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463-71.
- Tautz D. & Renz M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12, 4127-38.
- Teich K. (2003) *Actinobacillus pleuropneumoniae*; ein Erreger unterschiedlicher Pathogenität. *Witzenhäuser Schweinetag* am 21.03.2003.
- Temann U.A., Laouar Y., Eynon E.E., Homer R. & Flavell R.A. (2007) IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *International Immunology* 19, 1-10.
- Thacker E. L. & R. Thanawongnuwech R. (2002) Porcine respiratory disease complex (PRDC). *Thai Journal of Veterinary Medicine* 32, 126-34.
- Tohno M., Shimazu T., Aso H., Kawai Y., Saito T. & Kitazawa H. (2007) Molecular Cloning and Functional Characterization of Porcine MyD88 Essential for TLR Signaling. *Cellular & Molecular Immunology* 4, 369-76.
- Tonpitak W., Baltés N., Hennig-Pauka I. & Gerlach G.F. (2002) Construction of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 prototype live negative-marker vaccine. *Infection and Immunity* 70, 7120-5.
- Tuggle C.K., Schmitz C.B. & Gingerich-Feil D. (1997) Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (NRAMP1) cDNA. *Journal*

- of Animal Science 75, 277.
- Tumamao J.Q., Bowles R.E., van den Bosch H., Klaasen H.L., Fenwick B.W., Storie G.J. & Blackall P.J. (2004) Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. Australian Veterinary Journal 82, 370-4.
- Tümmler B. & Gerlach G.F. & das Fugato Konsortium IRAS (2009) Entwicklung von genetischen Markern zur Infektabwehr und Resistenz im Atemtrakt des Schweins (IRAS) - Aktueller Stand des FUGATO Projekts IRAS. Züchtungskunde 81, 27-35.
- Uddin M.J., Cinar M.U., Große-Brinkhaus C., Tesfaye D., Tholen E., Juengst H., Looft C., Wimmers K., Phatsara C. & Schellander K. (2011) Mapping quantitative trait loci for innate immune response in the pig. International Journal of Immunogenetics 38, 121-31.
- Uddin M.J., Grosse-Brinkhaus C., Cinar M.U., Jonas E., Tesfaye D., Tholen E., Juengst H., Looft C., Ponsuksili S., Wimmers K., Phatsara C. & Schellander K. (2010) Mapping of quantitative trait loci for mycoplasma and tetanus antibodies and interferon-gamma in a porcine F2 Duroc x Pietrain resource population. Mammalian Genome 21, 409-18.
- Uenishi H. & Shinkai H. (2009) Porcine Toll-like receptors: The front line of pathogen monitoring and possible implications for disease resistance. Developmental and Comparative Immunology 33, 353-61.
- Utrera V. & C. Pijoan C. (1991) Fimbriae in Actinobacillus pleuropneumoniae strains isolated from pig respiratory tracts. Veterinary Record 128, 357-8.
- Vallejo R.L., Bacon L.D., Liu H.C., Witter R.L., Groenen M.A.M., Hillel J. & Cheng H.H. (1998) Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility to Marek's disease virus induced tumors in F2 intercross chickens. Genetics 148, 349-60.
- Van Oirschot J.T. (1994) Vaccination in food animal populations. Vaccine 12, 415-18.
- Van Overbeke I., Chiers K., Charlier G., Vandenberghe I., Van Beeumen J., Ducatelle R. & Haesebrouck F. (2002) Characterization of the *in vitro* adhesion of Actinobacillus pleuropneumoniae to swine alveolar epithelial cells. Veterinary Microbiology 88, 59-74.
- Van Rens B.T.T.M., de Groot P.N. & Van der Lende T. (2002) The effect of estrogen receptor genotype on litter size and placental traits at term in F2 crossbred gilts. Theriogenology 57, 1635-49.
- Vergnaud G., Mariat D., Zoroastro M., Lauthier V. (1991) Detection of single and multiple polymorphic loci by synthetic tandem repeats of short oligonucleotides. Electrophoresis 12, 134-40.

- Vincent A.L., Thacker B.J., Halbur P.G., Rothschild M.F. & Thacker E.L. (2005) *In vitro* susceptibility of macro phages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus varies between genetically diverse lines of pigs. *Viral Immunology* 18, 506-12.
- Vincent A.L., Thacker B.J., Halbur P.G., Rothschild M.F. & Thacker E.L. (2006) An investigation of susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus between two genetically diverse commercial lines of pigs. *Journal of Animal Science* 84, 49-57.
- Visscher P.M., Thompson R. & Haley C.S. (1996) Confidence Intervals in QTL Mapping by Bootstrapping. *Genetics* 143, 1013-20.
- Vögeli P., Bertschinger H.U., Stamm M., Stricker C., Hagger C., Fries R., Rapacz J. & Stranzinger G. (1996b) Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to chromosome 6. *Animal Genetics* 27, 321-8.
- Vögeli P., Bertschinger H.U., Stamm M., Stricker C., Hagger C., Fries R., Rapacz J. & Stranzinger G. (1996a) Evidence for linkage of genes of the halothane (HAL) linkage group to the genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli* strains causing oedema disease and postweaning diarrhoea in Swiss Landrace pigs. *Animal Genetics* 27, 321-8.
- Wada Y., Akita T., Awata T., Furukawa T., Sugai N., Inage Y., Ishii K., Ito Y., Kobayashi E., Kusumoto H., Matsumoto T., Mikawa S., Miyake M., Murase A., Shimanuki S., Sugiyama T., Uchida Y., Yanai S. & Yasue H. (2000) Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishan×Göttingen cross population. *Animal Genetics* 31, 376-84.
- Wakelin, D. (1978) Genetic control of susceptibility and resistance to parasitic infection. *Advances in Parasitology* 16, 219-308.
- Wang E.-Y., Liang W.-B. & Zhang L. (2012) Association between Single-Nucleotide Polymorphisms in Interleukin-12A and risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *DNA and Cell Biology* 31, 1475-9.
- Wang S.J., Liu W.J., Sargent C.A., Zhao S.H., Liu H.B., Liu X.D., Wang C., Hua G.H., Yang L.G., Affara N.A. & Zhang S.J. (2012) Effects of the polymorphisms of Mx1, BAT2 and CXCL12 genes on immunological traits in pigs. *Molecular Biology Reports* 39, 2417-27.
- Wang Z., Rohrer G.A., Stone R.T. & Troyer D. (2000a) Isolation of thirty-one new porcine microsatellites from a microsatellite enriched microdissected chromosome 8 library. *Animal Biotechnology* 11, 33-43.

- Wang Z., Rohrer G.A., Stone R.T. & Troyer D. (2000b) Rapid communication: Twenty-six new porcine microsatellites from a microsatellite enriched microdissected chromosome 8 library. *Journal of Animal Science* 78, 3191-2.
- Ward C.K. & Inzana T.J. (1994) Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *Journal of Immunology* 153, 2110-21.
- Weber J.L. (1990) Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>·(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics* 7, 524-30.
- Weber G.F., Chousterman B.G., Hilgendorf I., Robbins C.S., Theurl I., Gerhardt L.M., Iwamoto Y., Quach T.D., Ali M., Chen J.W., Rothstein T.L., Nahrendorf M., Weissleder R. & Swirski F.K. (2014) Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis. *Journal of Immunological Methods* 211, 1243-56.
- Weber J.L. & May P. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics* 44, 388-96.
- Weber J.L. & Wong C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2, 1123-8.
- Weller J. I., Kashi Y. & Soller M. (1990) Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 73, 2525-37.
- White D.G., Zhao S., Simjee S., Wagner D.D. & McDermott P.F. (2002) Antimicrobial resistance of food born pathogens. *Microbes and Infection* 4, 405-12.
- Wilke P.J., Jung M., Chen Y. & Geldermann H (1994): Porcine (GT)<sub>n</sub> sequences: structure and association with dispersed and tandem repeats. *Genomics* 21, 63-70.
- Wilkie B.N. & Mallard B.A. (1999) Selection for high immune response: An alternative approach to animal health maintenance? *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72, 231-5.
- Wilkie B.N., Mallard B.A., Quinton M. & Gibson J. (1998) Multi-trait-selection for immune response: a possible alternative strategy for enhanced livestock health and productivity. In: Wiseman J. et al. (eds), *Progress in Pig Science*. Nottingham University Press, Nottingham, 29-38.
- Wilms-Schulze Kump, F.W.R. (2010) Untersuchung der Auswirkung infektiöser und nicht

infektiöser Faktoren auf die Atemwegsgesundheit der Mastschweine und deren Schlachtkörper. Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilian-Universität München, Deutschland.

- Wimmers K., Fiedler I., Hardge T., Murani E., Schellander K. & Ponsuksili S. (2006) QTL for microstructural and biophysical muscle properties and body composition in pigs. *BMC Genetics* 7, 15.
- Wimmers K., Kumar K.G., Schellander K. & Ponsuksili S. (2008) Porcine IL12A and IL12B gene mapping, variation and evidence of association with lytic complement and blood leucocyte proliferation traits. *International Journal of Immunogenetics* 35, 75-85.
- Wimmers K., Murani E., Schellander K. & Ponsuksili S. (2009) QTL for traits related to humoral immune response estimated from data of a porcine F2 resource population. *International Journal of Immunogenetics* 36, 141-51.
- Wu J., Zhou D., Deng C., Xiong Y., Lei M., Li F., Jiang S., Zuo B. & Zheng R. (2008) Expression pattern and polymorphism of three microsatellite markers in the porcine CA3 gene. *Genetics Selection Evolution* 40, 227-39.
- Wolz W. (1993) Anwendung von Mikrosatelliten als genetische Marker. Diplomarbeit am Institut für Humangenetik an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland.
- Xing J., Xing F., Zhang C., Zhang Y., Wang N., Li Y., Yang L., Jiang C., Zhang C., Wen C. & Jiang Y. (2014) Genome-wide gene expression profiles in lung tissue of pig breeds differing in resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One* 23; 9, e86101.
- Yan Q., Yang H., Yang D., Zhao B., Ouyang Z., Liu Z., Fan N., Ouyang H., Gu W. & Lai L. (2014) Production of transgenic pigs over-expressing the antiviral gene MX1. *Cell Regeneration* 3, 11.
- Yang X.Q., Chen Y.C., Wang L., Li H.T., Liu D., Guan Q.Z. & Fu B. (2012) Functional analysis of SNPs in porcine TLR4 gene. *Yi Chuan* 34, 1050-6.
- Yang L., Chonglong W., Zhengzhu L., Jingen X., Weixuan F., Wenwen W., Xiangdong D., Jianfeng L. & Qin. Z. (2014) Tissues Expression, Polymorphisms Identification of FcRn Gene and Its Relationship with Serum Classical Swine Fever Virus Antibody Level in Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 25, 1089-95.
- Yang F., Ma Q., Lei L., Huang J., Ji Q., Zhai R., Wang L., Wang Y., Li L., Sun C., Feng X. &

- Han W. (2014) Specific humoral immune response induced by *Propionibacterium acnes* can prevent *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in mice. *Clinical and Vaccine Immunology* 21, 407-16.
- Yao Q., Huang Q., Cao Y., Qian P. & Chen H (2008) Porcine interferon-gamma protects swine from foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 122, 309-11.
- Yonash N., Bacon L.D., Witter R.L., Cheng H.H. (1999) High resolution mapping and identification of new quantitative trait loci (QTL) affecting susceptibility to Marek's disease. *Animal Genetics* 30, 126-35.
- Yonash N., Cheng H.H., Hillel J., Heller D.E. & Cahaner A. (2001) DNA microsatellites linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens. *Poultry Science* 80, 22-8.
- Yue G.H., Beeckmann P. & Geldermann H. (2002) Mutation rate at swine microsatellite loci. *Genetica* 114, 113-9.
- Yunis R., Heller E.D., Hillel J. & Cahaner A. (2002) Microsatellite markers associated with quantitative trait loci controlling antibody response to *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* in young broilers. *Animal Genetics* 33, 407-14.
- Zhang C., De Koning D.J., Hernandez-Sanchez J., Haley C.S., Williams J.L. & Wiener P. (2004) Mapping of multiple quantitative trait loci affecting bovine spongiform encephalopathy. *Genetics* 167, 1863-72.
- Zhang Y., Tennent J.M., Ingham A., Beddome G., Prideaux C. & Michalski W.P. (2000) Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 189, 15-8.
- Zhang Y., Zhang L., Wang L., Qiao L., Liang J., Yan H., Zhao K., Liu X. & Wang L. (2014) Identification and examination of a novel 9bp insert/deletion polymorphism on porcine SFTPA1 exon 2 associated with acute lung injury using an oleic acid-acute lung injury model. *Animal Science Journal*, doi: 10.1111/asj.12330.
- Zhao F., Miller L.M., Chardon P., Rogel-Gaillard C. & Louis C.F. (1999) Five new polymorphic microsatellite markers for pig chromosome 6p. *Animal Genetics* 30, 394-5.
- Zhou Q., Lee G.-S., Brady J., Datta S., Katan M., Sheikh A., Martins M.S., Bunney T.D., Santich B.H., Moir S., Kuhns D.B., Long Priel D.A., Ombrello A., Stone D., Ombrello M.J., Khan J., Milner J.D., Kastner D.L. & Aksentijevich I. (2012) A Hyperomorphic

Missense Mutation in PLCG2, Encoding Phospholipase Cg2, Causes a Dominantly Inherited Autoinflammatory Disease with Immunodeficiency. *The American Journal of Human Genetics* 91, 713-20.

Zhou Y., Lin G., Baarsch M.J., Scamurra, R.W. & Murtaugh M.P. (1994) Interleukin-4 suppresses inflammatory cytokine gene transcription in porcine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 56, 50.

Žutić M., Ašanin Ružica, Milić N., Ivetić V., Vidić Branka, Žutić Jadranka & Ašanin Jelena (2008) Isolation and Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig's lungs and their sensitivity to antibiotics. *Acta Veterinaria Belgrade* 58, 499-507.

## 9 Anhang

**Tabelle 13:** Liste aller im Rahmen dieser Studie getesteten Mikrosatellitenmarker, deren Primersequenzen (5'→3'; oben Forward, unten Reverse) sowie Informationen über Informativität und PCR-Bedingungen. Die Mikrosatellitenmarker sind alphabetisch gelistet. Erklärung der Abkürzungen siehe Ende der Tabelle. Die verschiedenen Multiplexansätze und Referenzen sind durchnummeriert und in einer zusätzlichen Tabelle (Tabelle 14) sowie Literaturverzeichnis mit Quellenangaben für die Mikrosatellitenmarker aus Tabelle 13. Nummerierung ist entsprechend Tabelle 13. (S. 162) aufgeschlüsselt.

MS	SSC	Primersequenz		FS	I	PCR-Bedingungen				M-plex	Ref.
		Forward	Reverse			AT	K	Zyklen	Verd.		
APR3	3	CCCTGGGGAAAAATGGTATG	ATAACGCGTCAGGATTGTCC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
APR15	1	ATTGCCCAATGGAAATAAATG	TCATTCCAGTGACATTGCTTG	2	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
APR22	3	CAAAAGTTGGCTAAAGGAGGG	TGCAGCTTGTGGAATGATTG	2	J	66°	0.2	24	01:16	single	32
ACACA	12	TCGCCGAGATATAGAAAAGTTAC	TCCCAGGGCTTCTGTTTC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
ACO	5	ACAGCAAAGTGACCCAGCC	GTGAGAAATTGAAGTAGTCCC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	4
APOA1	9	CAGCTCCTCGGTCTATCTGG	TCTCTCCATCATTGTGCAGC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
APOB	3	TGTATGACTGGATCACTGTGC	CATCAAAGTACTCAGGATGT	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
BPI-2	17	TGAAGAGAAGGCTGCTGTGA	GGCTCTTTGTGTGAGTGTGC	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
BPI-3	17	TAAGGATCTGGCTTGGGTTG	CCCTTGGCTCTTATTGCAG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
BPI-6	17	TCGGACCTAGTGTGCTGTG	TCCGGAACCATGTTAAAAA	2	N	55°	0.2	24	01:16	single	14
CBD*	X	TGAGTGAAGCCTTACCCAG	TAACTGATAGACCCAAGTCGCC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
CD14	2	TGAACAGGAAAAGGGTGAGG	GGGTACCGCCCTAAAAAGAC	2	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	34	14
CD14-1	2	CACATCCAAGAAGCTCAACAA	GCCTGGGAACCTGCATAAAC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
CD40	17	GGGAGACAAAAAGGCACAAA	CCACGGAGTTAAGAAGTGGAG	1	J	60°	0.2	24	01:08	11	14
CD95-5	8	TGGTTATAAGAGGCTGGACTTTTT	TGGTAACCAAGAAAAGAAAAAGAAA	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
CD95-7	8	TGAAACCGTGGTGAAAAGGT	CTGTTGTGGCTCAGGTTGA	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
CH13	17	TTGGCATCCTTGTGAAAACC	TTCATATGCTGCAGGTGTGGC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	10
CHR1-4	15	GGCTGGCAGCTGTAGCTC	TAACTTATGAGCACAAAATTGTCTTCC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
CXCR2-BES	15	<u>AGACCCCTTTCCCAGCTCT</u> GCTTCTAGGGGTGATGTGCT	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
DG195S	6	<u>CGGGGTGCTTAGCATTG</u> GAACTCCATGAGCTTTTGACATG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
DG26	3	<u>GATTCCTTCTTTTTAGTGACTGAATG</u> GTCCAGAGCTCTCTTTGGG	2	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
DG33	8	<u>CTGAGCCTACAAATGACAGG</u> TATCTGCTATAGAGAGCATAGATG	2	J	55°	0.2	24	01:16	31	15
DG50	3	<u>CAAATATAACTGGGCCATTGC</u> CGTTGTTTCTAAGTGCTTTTGGG	2	J	65°60°55°	0.1	24***	01:16	41	15
DG79	6	<u>CTCACAATCAAAGATGGAAAGC</u> GGGATCAATCCATACTAATGAAGC	1	J	63°59°55°	0.4	24***	01:08	20	15
DG81	6	<u>GGGTTTGAGATACAACATTGC</u> CACAGTGGGAAATCCACAACG	1	J	63°	0.2	24	01:08	18	15
DG93	6	<u>GTTGAGTGAACATCCACTCTAGCC</u> GACCTCTTCTCCCCACTCTG	1	J	63°59°55°	0.1	24***	01:08	12	15
ENDO	17	<u>CCTCTCAAGATGTTCTGAAATCTA</u> TATTTATTGTACTGAAGGAGCAGG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
ESTMS16	9	<u>AGATTTCGCTCCACTGGGC</u> CACAGTACAAGGACTCCCCG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	33
ESTMS20	9	<u>TCCTTACCAAACCTCTGGAAGC</u> TTGGCTGCAAGAGAAAACAG	2	J	55°	0.2	24	01:16	55	33
GRP78	1	<u>GTTTCAATCAGTGGTGTGACAAGAG</u> GCTGGTACAGTAACAACATGCATGAG	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	20
IFNAR1	13	<u>CCTGGGAATCTCCATATGCT</u> AAGCAATGGGCTGTTTCTTG	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:08	5	14
IFNGR1-3	1	<u>CACACTGCTCCAAATCCAG</u> CCTCCCCTATTTTCCCCTTA	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
IFNGR2/ IFNAR1-4	13	<u>TCCATATGCCATGAGTGTGG</u> ACACATGGCACACATGTCCT	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
IGF1	5	<u>ACCCTTGAGAGGGTATTGCTAGGC</u> TGAGCATTCAATTTATGGGTTGATTG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
IL18R1-6	3	<u>CAGGGTGGGATATGCTGAGA</u> CCAACCCGTAAGTGAATAACA	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
IL23R-1	6	<u>CAACCCAGCCAAAGTAAAG</u> CCTCGGCAAACCTAACACTC	1	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
IL23R-3b	6	<u>CTGCCATCAAGTGGTAGAAGG</u> TTGAGGGGATACAGAGAGGAAA	1	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
KS110	8	<u>TGGATGAAGAGTTTGGATTGG</u> ACATCGAATTCTGGCTTTGG	1	J	60°	0.2	24	01:16	48	37
KS111	15	<u>TCTTGCTGTGGTAGGTGCTG</u> GGATGTGCCAGCCTGTATG	2	J	55°	0.1	24	01:16	31	37
KS115	10	<u>TGGACGAATCCGACTAGGAG</u> ATGCTTTCTCTAGTCTGGGC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	18
KS116	8	<u>TTGATTTGACATCGAATTTCTGG</u> TGGATGAAGAGTTTGGATTGG	2	N	64°	0.2	24	01:16	single	18
KS119	15	<u>ACCTGGGGAGAAGTGGTACC</u> TCTTTCCCAACACCCTCATC	2	J	65°60°55°	0.1	24***	01:16	35	37
KS141	8	<u>CAAGCCATTGATGCTTCATG</u> GGGTTTGATCCCTGGTCTG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M-plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
KS149*	X	<u>ATCTGACAGGCTGAGAGTTG</u> GCAGAAAGGCAGAATGGC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
KS150	8	<u>AAAAAGTCCTGTATCTTCCTGTGC</u> AAGGCAGTGAGAACTTTGTGTACA	1	J	62°	0.2	24	01:16	52	38
KS154	15	<u>AGGTTTCGCTCTTGGTGTTG</u> GTCCCTTCCACAGACACAG	2	J	62°	0.1	24	01:16	39	38
KS156	15	<u>ACCCTCATGCTGCAAATG</u> ACCCAAAGTCTTGGTCTACAGG	1	J	65°60°55°	0	24***	01:08	9	38
KS161	15	<u>CCTGGGAACCTCCATATCCA</u> TGACAACCTCCAAATCAGGA	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
KS168	8	<u>GGATGTGCCTGGGCTATG</u> TTGAATAAAGGCCAGCTTG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
KS169	15	<u>GGTGATAGGGACTTTCCAAGC</u> TACTGGGTTGGGAGGAGG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
KS173	8	<u>AAAGGTGAAAATGGGCTGTG</u> CTGGACATGCTTTCTACTGGTG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
KS186	8	<u>TTGTTGCAGAAAATATCAGTGC</u> AGAGTGGTAGGCGAGGGG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
KS199	10	<u>ACCTGGCATTCTCTGTTCTG</u> TTCTCCCATTTAGGGGGTTC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
KS604	13	<u>ATGGCAGGACTCAGACATCC</u> GCAGCTGTAGCCCTGATTG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
KVL140	9	<u>TCCTTTTGACCTACACAGAATCC</u> CCGAGTTTGTGTTCTGTCTCT G	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	20
KVL1568	3	<u>TTTACAACCTTGCATTCATTCAGG</u> CACCTCCTGGAATAAACTATCATG	1	J	55°	0.2	24	01:16	46	20
KVL1782	12	<u>GTGTTGCTTCTACTAAATCAGGTTG</u> AGGCAAGGTGTCCATTTTCC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	20
KVL2451	14	<u>TGGATCGCAACTAAATCTCTGTG</u> TAATCATTTCCCATCTCCCTCTC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	20
KVL2990	10	<u>ATCGGAGTGATGACAGAATGTGC</u> GAGCCCTGGAGCTGACTTGTC	1	J	55°	0.2	24	01:16	46	20
KVL3285	6	<u>ACACACTTAC CTCACGTTTATGG</u> ATATGGGCTTCATAACCACAGAG	1	J	55°	0.2	24	01:16	47	20
KVL4011	7	<u>GCAGTCCCCTTTCCTATGTATTG</u> TGATAGGAAAAGGTCTCTAAGGCAG	1	J	55°	0.2	24	01:16	47	20
KVL4016	14	<u>CTTATCCGAAGGCTGAAGACG</u> TGTCGCATCAGAGAAAGGTCTAG	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	20
KVL5200	15	<u>GATTGATGGGAGTAAAGTCATGC</u> GTGGAAGGAATGGGAAGAATC	1	J	55°	0.2	24	01:16	47	20
KVL6085	16	<u>GCCATTCCACATAGATTAAGAGAGC</u> AAGAGGCGTCCAGTCTGTCAAC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	20
KVL6370	14	<u>TGGGAATCAGGATCACCTTAGTG</u> GTTCTCAAATCTGAATAAGCGTC	1	J	55°	0.2	24	01:16	46	20
KVL838	10	<u>TCCAAAGTGACTTGCCAAAATAC</u> TCCCCTTAATACGTAACTCGCTC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	20
LOX12A	12	<u>CTTCAATGGTGCAGTGGGTTG</u> ACTTTAATCAGATACAGAAGTTGG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
LYSZ	5	<u>GCCTATTATCGGATATTGACGG</u> TTTTGGGCCCTTCATTACAG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
MN42	6	<u>GTCTGTGTGGAAGAGGCAGAAG</u> GCATTCTCCATGGGTTTGG	1	J	58°	0.3	24	01:16	4	40
MP75	12	<u>AGCTGCGGTATATGAAAACCTCCA</u> CTGCACCAAGAGATGAGGAAA	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
MP77	4	<u>GACCTATCTAATGTCATTATAGT</u> TTCCTCCTAGAGTTGACAAACTT	2	J	62°	0.1	24	01:16	38	19
pBD1-4	15	<u>GCCTCAGGAGTGTGTGTGA</u> TGTCAGTAGCCAGTGTGTGG	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
PIGNRAMP	15	<u>AAGCAGTGTCTCAACCTTTTC</u> CGATCCAGTCACCTCTAGGC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
PR39-1	13	<u>AGCCTCACCAACTCTGTGT</u> CCATATCACTTGTTCCTCT	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
S0001	4	<u>TGGATGGGTCTCATTCTCAG</u> TGATTCTAGCCTGAGAAGC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	13
S0002	3	<u>GAAGCCCAAAGAGACAACTGC</u> GTTCTTACCCACTGAGCCA	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
S0004	15	<u>GATTATGGACACGGAAGGAT</u> GTCCTATTCTTGACAGTC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	3
S0005	5	<u>TCCTCCCTCTGGTAACTA</u> GCACTCCTGATTCTGGGTA	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	13
S0008	1	<u>GAGGCAGTGTGTCTATTCA</u> GCCATGTGTAAAGTGTGCT	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	13
S0009	11	<u>AAACATACCAAGAAGCCAG</u> AAACATACCAAGAAGCCAG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
S0019	9	<u>TTCTTATTCTCTGTGTCTT</u> ATTGTTCCCTTCTTCTGA	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	3
S0022*	X	<u>CTGGGCAGCTCTATAATATC</u> TTACCCTTCTACTCTGTGC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	3
S0024	9	<u>AAAGAAGGAAAGAAGCTGATA</u> ATGGAGGATAATGTGAAAAA	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	9
S0025	7	<u>TCTCCCTCCCTCCATCTCT</u> CTCCATCAGCCAAAAACATT	1	J	55°	0.2	24	01:16	2	9
S0026	16	<u>AACCTTCCCTCCCAATCAC</u> CACAGACTGCTTTTACTCC	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	25	9
S0035	6	<u>GGCCGTCTTATACTCTCAGCATA</u> CCAAATAAACAGCAGGCAGCCT	1	J	70°68°66°	0.1	25****	01:08	28	5
S0036	2	<u>AGTGACGTGAGGTCTGCTCCTC</u> ATGGACGGTGGATTCACAGCC	1	J	65°60°55°	0.5	24****	01:16	23	6
S0038	10	<u>GGGTTTTCTATTGTGTACCATTGG</u> GCCTGACTTCACACTGTACTGCA	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
S0040	15	<u>AGCCAGGGCTTGGTAGAGAGA</u> TTTCTCTCCTGTCTAGCGGATG	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
S0056	1	<u>AAGCCACATCTCTCTTCT</u> ATAAGTTGCCCTACAC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0061	16	<u>AAGCAGAAGGGATCTCTCTA</u> GCTGTTTCTGGTTCTCTTA	2	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
S0062	18	<u>AAGATCATTAGTCAAGGTCACAG</u> TCTGATAGGGAACATAGGATAAAT	1	J	55°	0.3	24	01:16	53	29
S0064	7	<u>TGAGCTGGAGGTTAGCTACC</u> TGTCAGAAAAGACTGCTTGCG	1	J	62°	0.3	24	01:16	14	13

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
S0067*	4	<u>GGGAGCCACAACAAAGAAGG</u> GGCCTGGAGTGTGGGACTAG	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	30
S0068	13	<u>AGTGGTCTCTCCCTCTTGCT</u> CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
S0070	10	<u>GGCGAGCATTTCATTACAG</u> GAGCAAACAGCATCGTGAGC	2	J	70°	0.2	24	01:16	45	13
S0072	14	<u>CAGCACTTGGCTTCAGTTGC</u> TGCTGAGGGTTGCACAGTTC	2	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
S0073	4	<u>ACTGAAACAGGAATTCAGATCC</u> TGAAGTATTATGGCATCATGGA	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:08	20	13
S0087	6	<u>GACAAGCTCCAGGAAGCTTTCCTG</u> ATTGCCTTGTGATCCCAAGGGGCA	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	12
S0090	12	<u>CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA</u> GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	13
S0091	2	<u>TCTACTCCAGGAGATAAGCCAGAT</u> CAGTGACTCCATGCACAGTTATGA	1	N	57°	0.2	24	01:16	single	13
S0092	5	<u>GGGAAACACTAAATCACTTGCCAT</u> GGGATCAAGACTTCACACTCCCAT	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	13
S0094	3	<u>AGTTCTCAGGGAGTTCCTCATGC</u> CGAGCTCGCCTATCTATCAATTCC	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
S0098	8	<u>AAAAACTGAGCAGTAAAGTGAAAC</u> CGACTTCTGAACGTGAGCACCCA	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	24	34
S0101	7	<u>GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG</u> GTCTCCCTCACACTTACCGCAG	2	J	58°	0.2	24	01:16	single	12
S0105	16	<u>ACCATCGTCCAGGTGACCATG</u> CGCGACCATCTTCCTGTCAAA	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0112	1	<u>AATCCTGAGTATCCTTAATCAGGC</u> TTGACATGATGCAGAGAAGGAGTC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0114	9	<u>CTCACAAAACGGGATCTGTCCAGT</u> CTGTGTGCCATTCTTATCAAAGCA	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0116	14	<u>AACCCTGATGTGTGATGGGCTGGA</u> GGATTGAATGCTAAGGGACAATCC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
S0117*	X	<u>CAGGAAGCTGAAGCTGAGATTTGA</u> CTGTCAGGGAGCTAGTTTCACTCA	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	16
S0120	18	<u>GCCTAAGTAGAATTAAGCACAAAGG</u> GTGCTCTCACTGCCTTCATATACC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	16
S0121	6	<u>TTGTACAATCCCAGTGGAATCC</u> AATAGGGCATGAGGGTGTTTGA	2	J	70°68°66°	0.2	24***	01:16	single	26
S0141	2	<u>GATCTGGTCTGTCTTGTGTCCT</u> AGACCCCAACTCTTGGTCTCAT	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
S0143	12	<u>ACTCACAGCTTGTCCCTGGGTGT</u> CAGTCAGCAGGCTGACAAAAAC	1	J	68°	0.2	24	01:08	single	39
S0144	8	<u>ATTAGAGCCACCTGAAGGCT</u> CGTTGGTCGGCAGCTATAGC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0147	12	<u>AGCTGCAGCTCCAGATCATCT</u> GCTGTAAGCAGAGATTAACAC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
S0148	15	<u>TGGTGTAGGCCTGCAGTTGA</u> CCATCCATTGCTACTGGCAC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	39
S0155	1	<u>TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTG</u> AAAGTGAAAGAGTCAATGGCTAT	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
S0161	4	TAGAACTACTGTGTGATCCAG TCCATTTCATGTTGTACAGAT	1	N	65°	0.2	24	01:16	single	30
S0165	3	GTTAACGCTTCGGGATCCTGG GTTAACGCTTCGGGATCCTGG	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
S0176	9	ATGAGGCGCACGCACACGCAC TGTTGCGTAAGCATATCTCCCA	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	30
S0181	9	ATTCCACATGCTGTGGATGAG TTTCCTATGTTGCTTAAGCATAT	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0182	11	CTCCATATGCCACGGAAAT CAGTCTTCTCCAGACATAAA	2	N	55°	0.2	24	01:16	single	21
S0206	3	TGGGTGTGGTCAACAACCAA ACGTGCCTGCCTCTACCATC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	27
S0212	7	CCACGACTCAAACCTTAG TCTTTCTTAGAATATCTCACAT	1	J	50°	0.2	24	01:16	56	26
S0215	13	TAGGCTCAGACCCTGCTGCAT TGGGAGGCTGAAGGATTGGGT	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	26
S0216	3	TCCACCCTGCCAGTCACTT CTGGGCTTTGAACCCACA	1	J	68°	0.2	25	01:08	32	27
S0219	13	CCGCCAATGCCATTCCAA CACATCGGTAGTGTTTTACATTGAT	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	26
S0224	10	GGCTCTGGCGTAGGCCACT GGACCCTCCCATCCTCTCA	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0225	8	GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA CAGGTGGAAAGAATGGAATGAA	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0229	12	TTGGCATTACTGTCTTTAGTGACGA GGCCATATCTGGTATTGGGTGTCT	1	J	63°59°55°	0.4	24***	01:16	7	26
S0230	11	AACAGCCCAAGTGCCCAT TCCCCCTCCACTTCCTTC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0281	13	GTGGGTGTGGCTGTAAAAGAAATG AAAATTCAGGCCCAGACATATTC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	3
S0282	13	AACTTCCATATGCCACAGGTGC AGTGGAACAGAATGGAGAGCCC	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	10	10
S0289	13	AGGAGCATTGGCCACGTCTG TGTTGACCTTCTGTGATGGGGC	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
S0291	13	GGAGGGACCCATCTGACAGGA TTTTGGTGGGACGCTCCTGAC	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	30
S0296	17	TGAAAAATAACAAGAACCAC AAAAGCAAATAATGATAATAG	1	N	52°	0.2	24	01:16	single	3
S0298	16	ACATAACATCGTAAATCAGC CTCCATCACAGGTCTCACA	2	J	64°	0.1	24	01:16	40	30
S0301	4	CCGTCTACTTAGGATGTTT TGATGTGTTTATGTGTTGA	2	J	60°	0.2	24	01:16	36	30
S0316	1	CTATTAGGCTGGAGGGTTG AGTTCAGAAGCTGTTGCT	1	J	60°	0.5	24	01:08	16	11
S0320	1	TCCCACAATCCCTGACTACC AATCTGGTTTAATTGAGGGC	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:08	13	11
S0332	17	TGGTTTCTCACCAAGACAAGTAC CCCAAGGAGCTACAGCAAGGCAAG	1	J	63°59°55°	0.1	24***	01:16	7	16
S0334	7	CAAACAGAGCATAACATGCGGACTG ACCAAACCTGCTACAGCTGCTGTAC	2	J	65°60°55°	0.1	24***	01:16	33	16

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M-plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
S0354	1	<u>AGGGGATAGACACTTCCAACCTG</u> GTCCTTTTCAAAGGAAGACCG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0355	15	<u>TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG</u> TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
S0356	14	<u>TAGACATGTAACCTCTGGCTGG</u> AAGAAACCCATCTCTTGGGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
S0359	17	<u>CAACTTCTGGCTGCAGAGC</u> CTAGTCTGGGAGCTTCCATG	2	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	33	28
S0369	15	<u>GAGAGGAAGGAGAAGGAAACAAG</u> AGGTCTATGTGTCAGCATAAAGAA	2	J	60°	0.4	24	01:16	36	28
S0379	3	<u>CGGGTCTCTGCCACTAGAATG</u> GGTTTTGATTCCAAGCTCTTC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
S0385	11	<u>CTATTAGGCTGGAGGGTTG</u> AGTTCAGAAGCTGTTGCT	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	8	25
S0386	11	<u>TCCTGGGTCTTATTTTCTA</u> TTTTATCTCCAACAGTAT	1	N	57°	0.2	24	01:16	single	30
S0389	11	<u>TTTTGATACCTTGTCTTCG</u> TTAGGCTCATGCTTCTGG	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
S0391	11	<u>CTTCCATTCTTTTCATGGC</u> TGCGGTGTTATTTGCAGCA	1	J	63°59°55°	0.4	24***	01:08	12	25
S0394	11	<u>AGGAACTTTGAGAGGTATG</u> TATTTTGGTAGCAGACAGG	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
S0511*	X	<u>AAAAACACGGAAGCAATAGAAATGTC</u> GTCCATCCATGTTGCTCCAATGG	1	N	65°	0.2	24	01:16	single	30
S0533	11	<u>CCTATTGTCTAGTCTATAGAGG</u> GGGTAATGATAGCGGATATTTT	1	J	58°	0.1	24	01:08	6	24
SE259162	12	<u>GTCACTCAGGCTGGGAGAAG</u> CCACCTGTGCATTACACTC	1	J	70°68°66°	0.4	25****	01:08	26	30
SE45980	4	<u>GTTGGCCTGTGAACACCC</u> TGAGGATGCAAGGAGAGACC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
SE47329	3	<u>GCGACCTCTGACTTATTCTGC</u> AAAACCAGGCTAGGATCGTG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
SE47350	4	<u>GTGTTTCAGAGTTGCCATGC</u> CCTCTACGAGAGTCCGCATC	2	J	68°	0.2	24	01:16	44	30
SE47407	9	<u>ATAGATTTCTCCCCATGCC</u> TATTCGGCTAGGTTTGGC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
SE51018*	3	<u>TCTAAACAAAGGCAGGTGG</u> GGACTTCCATATGCTGTGGG	2	J	66°	0.2	24	01:16	single	30
SE77921	12	<u>CATCACCTAGGAGGTGGG</u> AAGTGTACAACTTTATTGCAGCG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
SJ001	11	<u>TATTTACAACAGCCAAGACAGG</u> CCCAGATGCCAAGATTTC	1	J	58°	0.2	24	01:16	57	22
SJ012	7	<u>GGAAAGGGGGCACAGGCTACG</u> GCCCTGGACAACTCCCCATCC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
SJ040	7	<u>GGTTTTATTTCGTCACIGTTTTG</u> GGTCTCCCTGATGTATGAAAT	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
SJ061	18	<u>GCAGAGGCACTCGGATGTTTAG</u> ACCCGGTGACAAAGCAGAGA	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
SN219	13	<u>CCGCCAATGCCATTCCAA</u> TAGTGTTTTACATTGATTACCGTTG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw1003	4	<u>GTCCATGTAGAAAATCCAAAGG</u> TTTAAACTCCAGCTGCATTGC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1006	9	<u>ACAGGCCAAAGACTAGAACATTGG</u> ATAGAGCCAGGAAATACATGTGTG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw102	3	<u>GATCAAGATGTACACAGGCATG</u> AACCTTCTATCTTCTCATGCCG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1023	18	<u>AACCTGCTGAGCCACAGTG</u> GCAAGTACCCAATCTTTTTTCC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1029	8	<u>ATGTCAGTCATGTGAATTACG</u> AGGTGCAGCCCTAAAAGGAC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1030	13	<u>AACTGGGGAAGTAGAAGAGCG</u> TCATCTCATGCCTGTGTCTAAA	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1031	17	<u>ATCACCCAGACAAAACAATCTC</u> TATGTCAACCCCAAACCC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw1041	10	<u>ATCAGAAAATGGTCAACAGTTCA</u> GGAGAATTCCCAAAGTTAATAGG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw1056	13	<u>GGTGGTTGTTCTCAAAAACA</u> TTTCTGGTGTACAGCAAAGTGA	1	J	68°	0.4	25	01:04	30	2
Sw1057	6	<u>TCCCTGTGTACAGATTGATG</u> TCCAATTCCAAGTTCCACTAGC	1	J	60°	0.2	24	01:16	16	29
Sw1071	5	<u>AGTGCTGATATCAAGCACAAGC</u> TCACTCCCACCCCTTACAC	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:16	49	29
Sw1073	4	<u>GGGTGCAGCCCTAGAAAAG</u> TCAGTACAGATTTGTTCCCCC	2	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	37	29
Sw1081	14	<u>AAACTGTAGAACCAGCTGGAGC</u> GACCCTGTAGCATTAGGACTGG	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	25	29
Sw1083	7	<u>CCTTGCTGGCCTCCTAAC</u> CATACTCCAAAATTTCTATGTTGA	1	J	62°	0.2	24	01:08	17	29
Sw1085	8	<u>CAGGCTCCCTGACTTCAGAC</u> TAGGTCCATCCATGTTTCTGC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1092	1	<u>CCTGCTATGTCTTATGCGGAGG</u> GATCCTGCATTGCCAAGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1103	10	<u>TCTCTGGATGTGAGATGCTAGG</u> TGCAAGGGTTTCAGGAACTC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1123	1	<u>GAGTCTGCCTGCATTGTGAA</u> TCTGTCTTTGTTTCTGTCTCTT	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
Sw1262	15	<u>TTGGGGCTCACAAAGTCAC</u> TTGGTAATTTCCGTATGCTGC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw129	13	<u>TTGTTTAGAAGTTTGGGTTGC</u> TTGCATGAACTTTTCAACACTG	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:16	49	29
Sw13	11	<u>TCTTAGCCAGTGCAGGCAC</u> GATCAATCTCTAAACTGAAGGTG	2	J	66°	0.4	24	01:16	42	29
Sw1301	1	<u>TGGATAAGCAATGAGGTCCC</u> TAGTGGATTATAATGTGCTAACCC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1303	7	<u>GTATGCTGCGAGGAGGCC</u> GAGGGCCACAAGTACAGCC	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1307	12	<u>TCATCCTTCCTTTCTTTATTCTT</u> TCTGGCTCGGATGCAATC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1315	3	<u>TTTCTGCTGTACAACCAAGTGG</u> AAGAATTCCTTTGACTCCTCCC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw1328	6	<u>TGATGCACAGTCCATCATCC</u> AGATGGAGTGGAATGGCTTG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1329	6	<u>GATCTCTCTGTCTTATCTACACAC</u> AACCTCGTCCTTTCTTAGCC	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1332	1	<u>GCATATGCTGCAGGTACGG</u> CAGCCTAAGCCAAGTATGTGG	1	N	63°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1339	15	<u>CCTCTGCAGAGACCTGTGC</u> AGGAAGAGAGCCGCCTTG	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1345	8	<u>CCTGTGCCAGTTCCATC</u> CATTGACTCCAGGTAGAGTCCC	1	J	60°	0.2	24	01:16	16	30
Sw1349	8	<u>CCTGTGCCAGTTCCATC</u> CATTGACTCCAGGTAGAGTCCC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1353	6	<u>TACTTGTACCCCTGCC</u> AAGTACGCAGGTCAGTCTGAG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1354	7	<u>GAGCCAGATTAATGCAGTTGC</u> CCTAGTCCCGAGCGGTAATC	1	J	58°	0.2	24	01:16	57	35
Sw1369	7	<u>AGCCTTCTGGCTCATGG</u> TCAAATGGAATCATCTCTCCC	1	J	63°59'55"	0.2	24***	01:08	20	35
Sw1376	6	<u>TGATTTACAATGTTGGGTCG</u> GATCATGTGAGAAAAAAGAATG	2	J	65°60'55"	0.4	24***	01:16	35	2
Sw1377	11	<u>TTCAAGGTTGGAAAGACAGTCC</u> ATGAGGAGTTTGAACATTGGG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1378	13	<u>ACCACACGTCTAATTGAAGAGC</u> TAAATCACAACCTTTGGGGATG	1	J	63°	0.2	24	01:16	single	2
Sw1380	7	<u>GAGGTGCCACCTGCTGAG</u> CTCAGTTGCTGGATGTGCC	1	J	58°	0.2	24	01:16	55	35
Sw1386	13	<u>GCTGCTTAGATGGAAAACTTG</u> AATAATGAAAGGACTCCTCCAGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw139	3	<u>CGACACCCTTGGGTTTTG</u> ATCTAAAATGGGCCTTTGGG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1400	13	<u>TCCTACTTCTCTCCTTCCCC</u> GCAACTCTTTCCCAAGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1414	14	<u>TTTCATTCTTTTAATGGCTGG</u> AGACACCCCAAAGTTCATAGC	2	J	62°	0.1	24	01:16	39	2
Sw1417	1	<u>GATCTCTCTCTTGGTTCTCG</u> AGAGCCAATTGTAAAGTCTGCC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1426*	X	<u>TGGTTGTCACAGTTTATGGG</u> TCCCTATCTTCTAAATGCTAGTAGG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1431	1	<u>TTGATGAGAACATGCAAGTGTG</u> AAAAGCATCCATGCCTGTG	1	J	65°60'55"	0.2	24***	01:16	24	2
Sw1435	9	<u>CAGGAACCTTCACATGCTGC</u> GTGTTGAGGGCTCTTCCTTG	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1443	3	<u>CAAAAGTTGGCCATGAATTG</u> TTCTCAGGAATCATTGTTACTTG	2	J	62°	0.2	24	01:16	38	2
Sw1450	2	<u>CAGGCCCTTAACTTTCAGTCG</u> TCATTGGTCTCTTAGACCTGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1454	16	<u>CAATGCCCTCACCTGTATCC</u> TTGTCTGCAGTTACATCCCC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1460	11	<u>TCCAAATTACGACTCTATCTAAAGG</u> CAAGCTGGACAGTATATCTTGGC	1	J	65°60'55"	0.2	24***	01:08	13	2

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M-plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw1462	1	<u>CTCTCTCCAGAGGGGTGTG</u> AGAATAACAGGGAAGGGAGAGG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1473	6	<u>TAAGGCTGAATCCACGCTG</u> ATGCAAAGATGCCAGATTC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1475	4	<u>CAGCTCCCTCGGGTAGAC</u> TGGAGAGGTAACAGAAAAGGG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1482	5	<u>ATTGCAGACTACAGTTCTTGCC</u> ACTTACGGGCTGATGCTGTC	2	J	55°	0.3	24	01:16	31	2
Sw1491	9	<u>TCACGTGCACACAAAACAC</u> CTTTGGTGCAGCTCCTG	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:08	15	2
Sw1513	4	<u>TTTGTATTTTCTGCAGTTTTG</u> GGCCACAAATCTAGCCTCAG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1515	1	<u>CTCCGGTTCCATTGTGG</u> GATCCCTGCCCAACAC	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:08	12	2
Sw1517	2	<u>CAAATGATTTTATCCATCCTTGC</u> TCTTAGTGATGCATTCTTAAGCTG	2	J	62°	0.1	24	01:16	39	2
Sw152	5	<u>GGATTTTAGGGCTGAATCTGC</u> GATGACCTTGCAATGCC	2	J	66°	0.2	24	01:16	42	29
Sw1557	14	<u>TGCTCTAATCTACCCGGGTC</u> CCACCCACTCCCTTCTG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1562	15	<u>CTCTAAGGCCAGAGAGCAC</u> ATCAGCTTGATCCATCAATGG	1	J	64°	0.2	24	01:08	22	2
Sw1564*	2	<u>ATCAGAACATAGAACGTGTGTG</u> GTTATATACCTGTTGGGAGACG	2	J	64°	0.1	24	01:16	40	30
Sw159	15	<u>GATTGGGAATTGGGGTTG</u> GCATTGTTGTTTCATTTCTGC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1608*	X	<u>CTAATGTTGACTTGATTAATGGGC</u> TGAAGCTTCTACTTAAGGAAGAATC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	1
Sw1626	10	<u>GCCAATTTCTAGCAAAGTGACC</u> TGGAAGATGACATAAGAAAAGGG	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:08	15	2
Sw1631	14	<u>TCAACACCAACAGAAGCCTG</u> TGCCGTAAAGGTAGAGGCTG	1	J	58°	0.2	24	01:16	51	2
Sw1632	11	<u>GTTTGACAGATAAGGCTCCTGC</u> ACACGCTCCCTAATCCCC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1650	2	<u>CAATTTCTGCTGAACAGCATAG</u> GGGTATAAAATCTTGGAAGG	1	N	52°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1653*	1	<u>TTAAGCTCTCATTGCTATGAGG</u> CCCACATTAAGAGACGTACGC	1	J	63°59°55°	0.4	24***	01:16	49	30
Sw1671	8	<u>GGAAGTCCTCATGTCAGAAACC</u> ATTGGCTCCTGAGTCCCC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1679	8	<u>GCCAAGAGGGAAGCTTATAGC</u> CAAATCCATTTAGATGGTAGGC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1680	6	<u>AGCCACCTAAATGTCCATCG</u> CATGTTGCTGCTAGTGCCAG	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	53	2
Sw1682	18	<u>GCCAATAAAACTATTCAATTTGGG</u> AACGAGCTAGACTTTAAAGGGTG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1684	11	<u>TTATTTAGGTGCAGATAGTTACAGC</u> TTATTTAGGTGCAGATAGTTACAGC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1691	13	<u>AATTTCTGCTGTACGCAAAGTG</u> ATCCTACTGTATAGCACAGGGC	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	30

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw1701	7	<u>AGGTAACCTCAGGTGTCAGATAGC</u> TCTAGTTTAAAAAGCCTGAATGC	2	J	65°60°55°	0.4	24***	01:16	37	35
Sw1708	10	<u>TCAATTCAACCCCTAGCCTG</u> TTCAAGCACTGACCTCTGTCC	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	25	2
Sw171	8	<u>CAGATTGTTTAGCCTCTGTGTG</u> CATCTTTTCCAATGACAACATG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw174	9	<u>GCCAAAATAGCTATTGGACAGC</u> TCATGCTATTTTGTCCAGATG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw18	16	<u>TTGTTCCCCACGTTCCCTG</u> CTGGCCTGGGAACCTACCC	1	J	55°	0.5	24	01:16	3	2
Sw1809	16	<u>AGGTAGCATCCCTAGTTTTTGG</u> CCCACATCAAGCCTTAGCC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	1
Sw1816	7	<u>AGCTCAGCTCTGCACTAGGC</u> TAACCCAGTGGGAGCAGAAG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1827	11	<u>AGTTTACATGGATACTCGGACTCAG</u> GGGGTTGTGTATATTTCTCTACTG	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1837	14	<u>GTTTTGCATCAGTTTCTCTCCC</u> TCAGATGGCGTCAGCAATAG	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1841	6	<u>TTCTCGAATCTGACCATGACAC</u> AGCTTCACTGATAAGGAAGTCACTG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1844	2	<u>TTTTATGGCTGAGTAGCATTCC</u> CAACCTACATTCATTGAGAGG	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1851	1	<u>GGCTTGGACATTCTCATTGG</u> GGTTGAGGAACCCTGATGTG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1873*	7	<u>ATAATCTGGTGAACCATCCCC</u> ATCAGATGTGCTAATACCCTGC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1879	2	<u>AGACACATGCACATGTGTTTTAC</u> AGCATTGTTTCTGGTTACTTTTAG	2	J	55°	0.2	24	01:16	31	2
Sw1891	17	<u>CTAGGTCTTTTCAACGTAAGCC</u> CTGCAGAAAGGAAGAGATGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1897	16	<u>GTGCCGTGGCAGGAACTC</u> ACTGCCATTGTTTTCAAAGTG	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	1
Sw1901	13	<u>TTCCAAATTACAACATAAGCTCAC</u> CTAGTCCTATTAATTGGGGGGG	1	J	60°	0.2	24	01:16	54	30
Sw191	5	<u>ATGATGGGAACCTCTGGCTC</u> AATTCTCAATGTCCACCATGG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1920	17	<u>GATCCGTATCTATAGCCACCTG</u> ATGAAAGCTACCAACCCTTCC	1	J	65°60°55°	0.4	24***	01:16	19	2
Sw1930	13	<u>CCCGAAAATGTGCACCTC</u> ATTCAATTTGCTGCACATTCC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1936	12	<u>TGAAAATAGGATGAAGAAGGGG</u> TTATGTGAGCACATGTGACACC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1943*	X	<u>ATTCCTTGACACATTAATGG</u> TATGGCTGAGTAGTATTCCATTTG	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1953	8	<u>TATTCAAATCGTGTCCAGCC</u> GAACCTGCTGTGTCTACAGCC	1	J	63°	0.2	24	01:08	18	2
Sw1954	5	<u>GATCGAACCCACACCACAG</u> TCATTTGGAATAAAGGGATTTC	2	J	65°60°55°	0.4	24***	01:16	35	2
Sw1956	12	<u>AGTCACCCCTCCAGGG</u> CAGCATCGGTCTAAAAACTG	1	J	60°	0.2	24	01:16	54	2

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingnngen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw1962	12	<u>AGTCAAATAGTGGAAAGAAGTAAAAG</u> AACATTTGGTAACTTATCTGCTTGC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1979	13	<u>TCCCCTTGCTGTATAGTGGG</u> ACTGGCTTTGTTTTACACATGG	1	J	55°	0.2	24	01:16	2	2
Sw1980	8	<u>GCTTCTGTATGCCACAGCTG</u> CCCCATTTGAACAATGAAG	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:08	20	2
Sw1982	5	<u>CATTATCAGCGACTTCAAGGC</u> TGGCGCTTCTATTGGAGTG	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Sw1983	15	<u>GCAGGTTTCGGCCTTAAAAG</u> CCACATAGCTCCCTGCTACC	1	J	70°68°66°	0.2	24***	01:08	27	2
Sw1984	18	<u>TTTTTAGTGTCCAAGGAGGTCC</u> GGAGCACTAATAGACCACCACC	1	J	58°	0.2	24	01:08	6	2
Sw1991	10	<u>CTCTGCAAACCTCCACCCTC</u> ACCACATAGATATAACCCCCC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2001*	7	<u>TTATCAATCCACCTGCTCCC</u> ATAGGCAACATGCGAGCC	2	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	33	30
Sw2002	7	<u>CACATGGTCTTTGCAAGCC</u> GTGTGCAAAGTTCATGCAGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2003	5	<u>CATGGAAAAAATGTAATTGTGG</u> CAGGAAACAGGGATAAAGACAC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2019	7	<u>ATGATGCGAACCTGGAACCTC</u> TATGTGTAACCTGGTCCCATGC	2	J	70°	0.4	24	01:16	45	2
Sw2021	3	<u>GCGACACATGAGATAAACTGC</u> AATCCACAGGCTTACTCAGATG	2	J	68°	0.2	24	01:32	43	2
Sw2034	5	<u>GCCTTCCTAATGGTGGGC</u> ATTGCAGGAAACAAGCTTCG	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2038	14	<u>GCCGAGAAACCCTTCACC</u> TAGCCTGTTTCAGTGCCACC	1	J	63°59°55°	0.3	24***	01:08	single	2
Sw2043	10	<u>CATATTGGGATAAATCATTTCATCA</u> GGTTTTAAATTGGCAAGCCA	1	J	50°	0.2	24	01:16	56	2
Sw2047	3	<u>AGACAAGACCAGGTTGGGTG</u> TTGGGTCTGAAAAGCGC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw205	8	<u>CACAGGTCCATCACCTCATG</u> GGGTATCTAATGTACATCACGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2052	6	<u>ACTCACTGTTTCCGGAGGC</u> CCCCTGTCATACATAGTTGC	1	J	65°60°55°	0.3	24***	01:08	9	2
Sw2067	10	<u>GAAGAAATTAATGCACGTCCC</u> TTGCTGCTTGTGCCTTG	1	N	52°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2074	9	<u>ATGTGATTATCATTGTCTGTAGCC</u> ATCCAGATTATGAGACACTTACCC	1	J	55°	0.2	24	01:16	3	2
Sw2083	15	<u>AAATTTTGTGAGTTTTGTGTGGG</u> ACACCTGAGAGTGTGTCTGTAGC	1	N	57°	0.2	24	01:16	single	2
Sw2093	9	<u>ATGCACCTGCTCAGAGGC</u> GTCTGTTGAGGCCATGGG	1	J	68°	0.2	25	01:04	30	2
Sw2097	13	<u>TGACTTGTCTTAGCCTCTGTTC</u> TTCCCTATGCTGCAGATGTG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2098	6	<u>ACAGAAGGAGCTACTTACTGTTTGG</u> ACTAGCTCTAAAATTCTATGTTGCATG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw21	9	<u>CGATTTTAAATGTGCAGCCG</u> CAGGAGCTGACCTATCTGGTG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	1

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw2116	9	<u>CAGTGTTTTGTGTGGATGGTG</u> CATAAATAGGGCTCAGTGACCC	1	J	70°68°66°	0.2	25****	01:04	29	2
Sw2126*	X	<u>CCTAAATGTCATCTATAAATGAATGAC</u> CATTATTTTGCCTTTTAAATAGCTGAG	1	N	60°	0.2	25	01:04	single	30
Sw2130	1	<u>TCCAAGTACAATGTGGTTTCTG</u> AAGCTCTTCCACTCTCCAGG	1	J	60°	0.2	25	01:04	single	30
Sw2134	2	<u>AAAATGATATGTACCACTCTGACCC</u> GATCCACACACATCCAGTCTATAC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2160	8	<u>TCTGCTTTTTTCCCCCTG</u> TTTCTCAGCAATCTGATTGGG	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	1
Sw225	13	<u>AGGACCCACCAAGAGTTACC</u> TGCTGGTAATGGGTGATTAGG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw24	17	<u>CTTTGGGTGGAGTGTGTGC</u> ATCCAAATGCTGCAAGCG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw240	2	<u>AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG</u> AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	1	J	62°	0.2	24	01:16	17	29
Sw2404	4	<u>TGACAGCCTCCTGGTTCC</u> AGCTGTCGTGTTTTTCTCTCC	2	J	68°	0.2	24	01:16	44	1
Sw2406	6	<u>AATGTCACCTTAAAGACGTGGG</u> AATGCGAAACTCCTGAATTAGC	2	N	66°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2407	9	<u>ATATACCCGGGCTTTTTTGG</u> TTGACACGAGAAGCCCATC	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2409	4	<u>ACTGGTGCCTTACAAGAAGGG</u> CTTTGCCATAATCTTCACATGG	2	J	64°	0.2	24	01:16	40	1
Sw2410	8	<u>ATTTGCCCCCAAGGTATTTT</u> CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	1
Sw2411	16	<u>CCTGGACTCATTCTGTCTTTG</u> TTCCTATTCTGTCCTGCCTTG	1	J	58°	0.2	24	01:16	single	2
Sw2425	5	<u>ATCTCCATAGGTCAGAGGCTC</u> ACTCTGTGAGACATTCTGTATTCC	1	J	70°68°66°	0.2	24***	01:08	27	1
Sw2427	17	<u>GCATGTTATTGAGTTGATGTGAGG</u> TCGGAATTCCAGAAAATTGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	1
Sw2428	7	<u>AGGTTCTGGGAGGTGTGTG</u> TTATGAATGGGATATTGTCGTG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	35
Sw2431	17	<u>CTTCCCAGGATGTTGTCTAAAC</u> CATGGTGCACACTTAGTGGG	1	J	70°68°66°	0.4	25****	01:08	26	1
Sw2432	1	<u>CCCCAGTACCTGCACAGG</u> AGGGAGGGAGAGTGAGACAG	1	J	70°68°66°	0.2	24***	01:08	27	2
Sw2435*	4	<u>CAAAGCAGATGCACAGTTTAGG</u> CAGAGGGTTGTTGGTGGG	1	N	53°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2440	13	<u>CTGGTGTGAAACCAATCG</u> CCCCATAAGGACAGCAATC	1	J	62°	0.2	24	01:08	17	1
Sw2441	17	<u>TCCAACCTAAATGTCCATCATC</u> CACAAATGGCATTATTTTCATCC	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	21	1
Sw2443	2	<u>GAGCACAGAAGATTTTTAGGGC</u> TTAGTTTCTCCTGGGCTGTG	1	J	65°60°55°	0.3	24***	01:16	23	1
Sw2446	7	<u>GAGAGAGGTGGCAGAACCAG</u> AGGGACAGAGCTGCATGTG	2	N	65°	0.1	24	01:16	single	30
Sw2456*	X	<u>GAGCAACCTTGAGCTGGAAC</u> AATGTGATTGATGCTGTGAAGC	1	J	60°	0.2	24	01:16	11	1

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M-plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw2458	13	TGCTCAGGGGGAGGAAAAG TTTCAAGCCACCGTGAAGTC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	1
Sw2470*	X	TAGTACCTAGGCTTCCCCAGG CTTTGTCTCTCCCTCTCCATAC	1	J	60°	0.2	24	01:16	10	1
Sw248	3	CCATCCACGTTTTTATAAATGG CAACCTAAGTGCCATCAATGG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
Sw2488	14	TCTTCTTAGAGCTGAATATGAACCC TCTTAGTATAAGTGCTGGTGCAGC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw249	10	GAAAGCAGGACTTGCTCCTG ATCATCACTCTCCCAACATGG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
Sw2509	4	TGCTGAGATTGAGAAAATTCTGC TCGTCGAGGTACAGCCCTAG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2512	1	TCTGTCCATCCCTCCATCTC AGAAAGTGAAAATTGAGCTGGG	2	J	60°	0.2	24	01:16	36	2
Sw2515	14	CCATCTCATCCAGAAACATCC AGGATGCTGAGGTGTTAGGC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2519	14	CGTCTCCCAGTAGGCTTTG GGATACTAAGTGTCTCCCCC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw252	7	CTCTGGGTCCATCCATTTG TTATGATGCAAAAACATGGAAGC	2	N	66°	0.2	24	01:16	single	29
Sw2521	8	GTGCGCTGGTGTGTGTC GAGGTGACTTCTGCAGGTCTG	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2525	6	CCTGCAGAGGCACAGTTT CCACTGGTCACCATTACGC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2532	3	TTCGACACACAGGTTTTAGGG GTGGAGGCTTCTGAAATGTACC	1	J	58°	0.2	24	01:16	50	2
Sw2534*	X	TGAGTGAAGGCCTTACCCAG TAACTGATAGACCCAAGTCGCC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2537	7	CAGACTGTCTGAGGCTCCC CAGAGCCTCCCTGCTCAC	2	N	68°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2540	18	AAATTAGGTCTCCACGGAGC AAACACCTAACCAAGTACACACC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw2559	12	GCCAAGGAGATGAAGTATGTG TTGAATTCAGGATGGACAGG	2	J	65°60°55°	0.4	24***	01:16	37	2
Sw256	2	ACAAAAGCTTTTGGAGAACTCG TAGCATAGGAACAGGTGCAGC	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
Sw2588*	X	TGCTTCTTCCCCCTCCC AAAGCCTGGTGAGGACCC	1	N	68°	0.2	24	01:16	single	30
Sw262	16	TACTTGGCTTTTTGTGACCAG TCAGCCAAAGGGCTCTTG	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
Sw2623	2	TCGGAGAATGAGGTAGCTGC GATTCCACTCTGCTCGAGATG	1	J	62°	0.2	24	01:08	14	1
Sw288	14	AAAATAAAAAGCATGGCCTGC GGGAAAAAACATGTAATTGCC	2	J	62°	0	24	01:16	38	29
Sw301	1	AACCAAGCCACTTTCCCAC GCTGAAATGCCCATCTGG	1	J	64°	0.2	24	01:08	22	29
Sw314	3	CCTCCTTGAGCCTACCCTTC CCCTAGCCCTGGAACCTCTG	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:08	12	29
Sw317	4	TTAGTGTCTGGGCAAGGAG GGGATGCTAAAGTTGGAGGG	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	29

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw322	6	<u>CATTCAACCTGGAATCTGGG</u> TCCCTGGAAGGCTACACC	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
Sw335	17	<u>GAGTATGGGGAAAGCCACG</u> CCATCAACAACTGTATGCACC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	29
Sw344	13	<u>AGCTTCGTGTGTGCAGGAG</u> GTAGTGGTCCAAAGAGAGTGCC	1	J	62°	0.2	24	01:08	17	29
Sw349	3	<u>CCTGTTGTAGGCTCCATGAG</u> CTAGGAGTCGGCCCTGAAC	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	19	29
Sw374	8	<u>AGTAATCCCATCCTCCCCAG</u> TGCTCTCCAGCCCTCAAG	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
Sw378	5	<u>ATTATGCACCCTACTCCCC</u> GATTTCTTCTTTGTTGTGCC	1	N	63°	0.4	24	01:16	single	29
Sw38*	13	<u>ACGTCTGTGTCGGTGCCT</u> GAGGCTCCTGATAGCAGCC	1	J	60°	0.2	24	01:16	8	29
Sw395	2	<u>TTCCAAGTTATGGAGATATCC</u> GATCCCTACCTCACACCACA	1	J	60°	0.6	24	01:08	11	29
Sw398	13	<u>AAGTGCCAATGCTTTGTTC</u> CGGAGGAGAAATAAGGGTAGC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
Sw413	5	<u>CAGACACACACCCAGTGTC</u> AGGTCCAACCCTCCTGATG	1	J	63°59°55°	0.3	24***	01:08	15	29
Sw419	16	<u>AATGGGAAATAGGCTCTAAGCC</u> TCCCTCCCTATACATGTGC	1	N	66°	0.2	24	01:16	single	29
Sw443	10	<u>ACAAAGGCCAAGCCACATAC</u> TCACCAGGTTTCTGGGTTTC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw45	4	<u>TATGACCTGGTTGCTATGTTGG</u> TGTTTTCTCCCTCAGATTACC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	23
Sw467	12	<u>TATACCTTAGCGCCTACGAGC</u> CTCAGCCGCTTGGATAACTC	1	J	59°	0.2	24	01:16	51	29
Sw480	4	<u>TGCCTGGAAAAGGTCTGC</u> CTTCTCTCCTTGTGCCCCTG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw489	4	<u>CAAGTGTGAAATTTGTGCGG</u> CGAAGTGCTAACTATAAGCAGCA	1	J	55°	0.2	24	01:16	single	29
Sw491	5	<u>TTTAAGCCACTGCACCAGG</u> CAGGGAACCTCATAGTCCC	2	N	63°	0.4	24	01:16	single	29
Sw492	6	<u>TCCATCAGCTCACATAGTTAGC</u> ACCATGACAGGAACTCCGAG	1	N	54°	0.2	24	01:16	single	29
Sw497	10	<u>TTAGGAACGTCTGGGTTTGG</u> TGGGAGCTTCCATGTGTTG	1	J	64°	0.4	24	01:08	22	29
Sw512	4	<u>TATAGTGCAGTTATATCTCAATACAAATGG</u> TCTGACATTAATACAACCACCCC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
Sw520	13	<u>GCCACCGGTGTGACTCTAAA</u> CTTTCCCAAGTTCACCTAGCA	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Sw524	4	<u>ACCAGGTTGAGTCACATCTGC</u> AGGTCTGGTACCCGTCCTG	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Sw539	9	<u>CCCATCCACGCTAAGAAGAG</u> TCAACGGGAACAACCTGAAG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw552	1	<u>AAGAGCCAGATGGGGAGG</u> ACTGATAAGACATGCTGTGTGC	1	J	63°59°55°	0.1	24***	01:08	5	29
Sw575	2	<u>CTACAGCCGGTGGCTACAG</u> AGGAATCCATTCAGCCTGG	2	N	68°	0.2	24	01:16	single	29

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw58	4	TCCTACCAGAAATCTACCACA ATGGGAAGAGAATCTGACAAGG	2	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	41	29
Sw581	7	CCCCAGATTGACTCTAGACTCG CATGATGGAGGATAATGTGGG	1	N	57°	0.2	24	01:16	single	29
Sw590	3	ATTTGCTGAGAGATAAGGTGCC GCATTGACCAGGGTCAGG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw61	8	GAGAGGGATGAGCACTCTGG AGAGCATTCCAGGCTTCTCA	1	N	68°	0.4	24	01:08	single	29
Sw63	14	GAGAAAGGCAAACGCCTG GTGGCTGTGGTGTAGGCC	2	J	68°	0.2	24	01:32	43	29
Sw64	1	AGACCAAGGGCCATGAGAG TTCCACGTGATGTGGGATAG	1	J	57°	0.2	25	01:16	single	29
Sw705	1	CTGAAGTCTTGAGATGAAACGC TGTAGAGCATTTCAGAGGAAGC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
Sw72	3	ATCAGAACAGTGCGCCGT TTTGAAAATGGGGTGTTC	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	8	29
Sw724	4	GTGCATTAATGTCCACGTATGG TCCTAAAGGACCGAATTTAAAA	2	N	55°	0.2	24	01:16	single	29
Sw742	16	AATTCTACTTCTGGGGAGAGGG CTTTTGGGAACATTTCTGCC	1	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	21	29
Sw745	1	CTGAGTCTTCTGGGAACATTTTC ACAGGGCTGGTAGTGCCC	1	J	62°	0.2	24	01:16	19	29
Sw749	9	TTCCCAAACCAACCAAGAG AGGAACTTGCCAAAATCACG	1	N	60°	0.2	24	01:16	19	29
Sw752	4	TCAAGAAATAAGGACAGGAACC CTACCTTCCATTGATGCTG	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw761	14	CTTTGCTCCCCATTAAGCTG TCTAGCAAATGTCTGAGATGCC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw763	8	GGGTGCATTGTCTCATATGG TGCTCTAGCAACACACACC	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
Sw764	7	TAGCAGATTGTTTAGCCTCTGTG AAGCATCTTTCTAAGCACAAACA	1	N	57°	0.2	24	01:16	single	29
Sw766	2	AATCAATTGTCTCCACTTCAGG AATTCTGCCTTGTCCAAAGG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw767	10	TGCGTGACTIONAACCCTGTG TCACGCAGAACGTTTCAGAC	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
Sw769	13	GGTATGACCAAAGTCCTGGG TCTGCTATGTGGGAAGAATGC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw780	1	TCTACCAGCTAAATTGCTCACTG TAGGACCTGGAATATACTCCCTG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
Sw790	8	CATACACCCAGATGTGGC CTGTGGGAGTGTAGCATCTTG	1	J	60°	0.1	24	01:08	11	29
Sw792	5	TACTGGGGTGAGCTTGTGTG TTCCCTCTCTCTTTCC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
Sw803	1	GGTCACAATGAGGGCACTC TCCCAAGCAACAGAAGTGC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw827	9	AGCTGATTCCTCCAGGC TTATCTGAATTGTGGTGTAGGC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw828	3	AGAATACAGCACAGTGCCTGG ATATCCCAGTGTCTGCCAGC	2	N	62°	0.2	24	01:08	single	30

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M- plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw830	10	<u>AAGTACCATGGAGAGGGAAATG</u> ACATGGTTCCAAAGACCTGTG	1	J	70°68°66°	0.2	25****	01:04	29	29
Sw834	2	<u>GTGAGGGATGGACAGGTCAT</u> AAAAAATCCACCCTCAACACA	1	J	70°68°66°	0.2	25****	01:08	28	2
Sw835	4	<u>TGGCTCAGAGTTTTTCACTCTG</u> CAGAGGTTTACCAAGTTTTGGC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw839	4	<u>GGAAACCAGGATAACAGGAGG</u> TAACCCACTGTACCACCAAGG	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	23
Sw840	17	<u>CCTGGAAACAACCTAAGTGTCC</u> TTCCACATTAGTTCCGGGAC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	29
Sw856	4	<u>AGGGGGTGGGTGATTGTG</u> AACTTCCCATGCTGCTG	1	N	53°	0.2	24	01:16	single	30
Sw857	14	<u>TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC</u> GATCCTCCTCCAAATCCCAT	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
Sw859	7	<u>TTCAGTTTTGGTGTAGCCCC</u> CAGGTGTGGCCCTAAAAAGG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw864*	13	<u>TTGCACAGATGCTAATTCTTCC</u> TTAAGACTGTCTTGGGCATTCC	1	J	60°	0.4	24	01:16	53	30
Sw874	12	<u>AAAAGAACCCTACTACAGCAGC</u> TTTATGAGGGTATCCTGACACC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw882	13	<u>TGGGTCTCCATCATCATGTG</u> TTTTCCGGGGAAACAGAAC	1	J	63°59°55°	0.1	24***	01:08	5	29
Sw886	14	<u>AATTGGTTTGTCCAGAATTGG</u> GATCATTCCCATTGTGTAATT	1	J	63°59°55°	0.3	24***	01:08	1	29
Sw903	11	<u>TTTCTTTGACAGTTGTGCAAGG</u> TGAACTACAGCAGCGACCTG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw911	9	<u>CTCAGTCTTTGGGACTGAACC</u> CATCTGTGGAAAAAAAAAGCC	1	J	63°59°55°	0.2	24***	01:08	20	29
Sw920	10	<u>CATGGAGCTGAACTTGCAAA</u> ATCAAGCCCAACTTAAGAATACA	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw935	13	<u>GTGGTGGTTGCCTCTTATAGC</u> ATATAAGGGAAAATAATCTGAAAGAGTATG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Sw938	15	<u>TTATTATTTCCATTGCCATTGG</u> CACTTATGATGGAACATGATGG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	29
Sw943	12	<u>AGGAGGACTAGAGCGCCTG</u> AGAGAGGCCAAGAATAGAACCC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	30
Sw949*	X	<u>TGAGCAATGAGTTCAATGCC</u> TCGTTGGTGAAGGCATCC	1	N	57°	0.2	24	01:16	single	30
Sw955	13	<u>CTGCTCAAAGTTTATCTTCCCC</u> GTCACTCCACTCTGTCTTTCCC	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	30
Sw957	12	<u>AGGAAGTGAGCTCAGAAAGTGC</u> ATGGACAAGCTTGGTTTTCC	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	29
Sw963	5	<u>TCTGTGTTTCCCACCAGC</u> TGTGCACCTGACACATAGACTC	1	J	62°	0.4	24	01:08	14	2
Sw967	5	<u>AGCAGACTGTTCATCTGTTCAG</u> GGGGCAGCTGAAAAGTCC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
Sw973	6	<u>CACAGTTTGCATTGTGGGTC</u> TAGGGGGCCCGTAAAGTC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Sw974	1	<u>GGTGAAGTTTTTGTCTTGAACC</u> GAAAGAAATCCAAATCCAAACC	1	J	58°	0.2	24	01:16	50	29

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M-plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Sw980*	X	<u>CTTCAGTGTAGTCCAAGTGGC</u> GATGTTTTGCTGATAGGAAGGG	1	J	58°	0.2	24	01:08	6	30
Sw983	9	<u>GCAGTCCCCTCTTAGGTATATATCC</u> ATAATGCTGCTATGAACACTGTAGTG	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Sw989	9	<u>CTCATTAATTTAATTGAGTGAGTGTG</u> CCCGTGGTTCTGACTGAACT	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	29
Swc19	10	<u>CCAGGACACAGTGAGGGG</u> AAGCCAGGTTGTCCCTCC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Swc23	12	<u>TACCCCTCAGAGTGACCAG</u> CAAAGGAGCATGTTTATGGATG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Swc27	14	<u>CTGAGACTGTGCTGCTCACTG</u> CCATTTTCCAAAAACATGGG	2	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	35	1
Swc4	6	<u>CACACATCTCTGCGCAC</u> CCTGTGCTCAGTGGGAGG	1	J	65°60°55°	0.3	24***	01:08	9	2
Swc55	14	<u>AAAGGAACAGGGGCATCAG</u> CCGTATTCTTACCTGTGGAGC	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Swc335	17	<u>GAGTATGGGAAAGCCACG</u> GCACCATTGTGTACGAATGTG	1	J	55°	0.2	25	01:16	single	31
Swr1004	17	<u>TGGGAACACCTGCTTCATC</u> TCCATATGCCCAAGTGTG	2	J	60°	0.2	24	01:16	single	29
Swr1014	9	<u>GCATCAAACTAGGAAATTGGC</u> ATTGACCCCTAGCCTGG	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Swr1021	12	<u>CGCCACAAGTGAAGTCC</u> CCGCGGGTCCAGCTATAG	1	J	58°	0.4	24	01:16	4	29
Swr1061	1	<u>ATCTGCCTTGTGTCTGCATG</u> TGGCATTGCTGTGGCTATG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Swr1078	7	<u>GCTGGGGAGTAGGCCAGT</u> CCCTCCTCGCAAATCTTTT	2	J	65°60°55°	0.5	24***	01:16	41	35
Swr1101	8	<u>AACTTCCATATGCCACAGGTG</u> GGTCCTCCTCAGAAAGTCCC	1	J	70°68°66°	0.2	25****	01:04	29	29
Swr1110*	4	<u>AGATGCGGCTCCAATCTG</u> AGATGCGGCTCCAATCTG	1	J	59°	0.2	24	01:16	51	29
Swr1120	17	<u>CAAATGGAACCCATTACAGTCC</u> ACTCCTAGCCCAGGAGCTTC	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
Swr1133	17	<u>TGGGATTGTACCAGTACGAGC</u> TCCATGGGTGAAAAAAGATG	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Swr1343	7	<u>GATCTGGCATTCATGTGC</u> CTCCTAGCCTGGGAACCC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Swr136	10	<u>TTCTCTGCCGTCACTCACTG</u> CTGGGACCTCCATATGATG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	29
Swr1445	2	<u>CTGGGAACCTCAAATCAAATG</u> AGGAGTGGCCCTAAACACAC	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
Swr1533	8	<u>ATTTCTTCTTCTTCTTTGTGTG</u> CTGGGAAGCTCCATATTCCA	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Swr1637	3	<u>ATGAGGACGCAGGTTCAATC</u> CACTGTGCCACAACAGGAAC	1	N	65°	0.2	24	01:16	single	30
Swr1801*	8	<u>GTTTTATTTCAGGAGTTTATTTC</u> ACTTCCATATGCCACAGATGTG	2	J	65°60°55°	0.4	24	01:16	34	30
Swr1802	12	<u>GATCACCCCTGGAAATTCT</u> CTCCATATGCCTCGGGTG	2	N	68°	0.2	24	01:16	single	30

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M-plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
Swr1848	9	<u>AAGGGGAAAATCCCTCAAAG</u> TTTCTATGCAAATTTTCCGTG	1	N	53°	0.2	24	01:16	single	1
Swr1861*	X	<u>TACAGCTCCGTTGGTCC</u> TAGCTCTGAGTGTACTTGCGC	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	30
Swr1910	2	<u>GGACCTACTGTAAAGCACAGGG</u> CATTAACTCATTGAGCGAGGC	1	N	65°	0.2	24	01:16	single	30
Swr1941	13	<u>AGAAAGCAATTTGATTTCATAATC</u> ACAAGGACCTACTGTATAGCACAGG	1	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Swr1998	4	<u>CCGTGTGCTTTGGTGTAGG</u> ATGGAATCAATGGCATTTCCTG	1	J	62°	0.2	24	01:16	52	2
Swr2071	11	<u>TGGGGATGAGGGAACTTC</u> GAGGATAAGACCCGCTACC	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	30
Swr2157	2	<u>ATCAGTACTTTTAGCAATGATAGCC</u> AAAGAGACTTAAGTTCCCCAG	1	J	55°	0.2	24	01:16	2	2
Swr2480	16	<u>TTGAGGAACTGCCCTACTGG</u> ACTGGTTATGGAGCATGATGG	1	J	55°	0.2	24	01:16	3	2
Swr308	2	<u>TCCAGTCCCTTGGTCTCTTG</u> TTAGCCTGGGAACCTCCATG	1	J	70°68°66°	0.2	25****	01:08	28	29
Swr312	15	<u>ATCCGTGCGTGTGTGCAT</u> CTGGTGGCTACAGTTCCGAT	1	J	60°	0.2	24	01:16	single	29
Swr345	2	<u>AACAGCTCCGATTCAACCC</u> TACTCAGCCTTAAAAGGAAGGG	1	J	68°	0.4	25	01:08	32	29
Swr414	18	<u>GATTTGACCCCATGCCTG</u> AAGGCAAACCCCTTGAGTTC	2	J	57°	0.2	24	01:16	single	2
Swr453	5	<u>TTGAATTTTTTTCATGGAAACC</u> TCTGGACTTGCTGTGACTGTG	1	J	63°59°55°	0.4	24***	01:08	1	29
Swr67	2	<u>GTCCTCATGGAGACTAGTTGGG</u> TCCATGCCATGGACACAG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	30
Swr68	9	<u>TTGACCCCTAGCTGGGAAC</u> TTTCGTGGGCTTAGTGGC	2	N	68°	0.2	24	01:16	single	30
Swr773	7	<u>GTGGCTGGGGTATAGGCC</u> TGCTGAAGCATCCACTTAC	1	N	50°	0.2	24	01:16	single	30
Swr783	2	<u>CATACCTGCACATCTCTCAGC</u> GCAGCTATAGCTCCGATTGG	2	N	62°	0.2	24	01:16	single	29
Swr85	3	<u>GGCTAAGCCACCAAGAGAAC</u> ACCTCTAGCCTGGGAGCTTC	1	J	60°	0.2	24	01:16	54	2
Swr978	3	<u>CCCGGTGATGTCAAGTGAC</u> CATATGCCGCAAGTGCAG	1	N	63°	0.2	24	01:16	single	29
SY1	15	<u>GGAGCAACAGAGGTAGCCAG</u> TGGGTCAAAGCAGACTGTTG	1	J	55°	0.2	24	01:16	3	36
SY12	5	<u>CAGCAAAGTAACCCAGTCTCTC</u> ATGAAAATGTTCCATCCGG	2	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
SY19	8	<u>CTCCCTTCCAGCCCTTC</u> ATACAAGCAATGTAGCAATGTTCC	2	J	65°60°55°	0.2	24***	01:16	34	8
SY3	9	<u>TCCAGTTCCTTGGTGGAAAC</u> CTCCGAGGCTGTAGAACCAG	1	N	58°	0.2	24	01:16	single	30
SY4	18	<u>TGTA AAAAGATTTAATAGCCTGCCTC</u> TGTTTTATTCTTTCATGATTTTCATG	1	J	65°60°55°	0.4	24***	01:16	10	7
TCRGM5	9	<u>CAGAATTC AACTCTCCTCAAAGG</u> CCCAAGTATTGTGTAGCACTATGTG	1	N	55°	0.2	24	01:16	single	18

MS	SSC	Primersequenz Forward / Reverse	FS	I	PCR-Bedingungen				M-plex	Ref.
					AT	K	Zyklen	Verd.		
TF-1	13	<u>ACAGTGACTGGAGCAGAGCA</u> AAGCCAGGATAGTAATTGAGATTC	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
TFR1-9	13	<u>GAAGCCCAGAAGCTCTGAAA</u> AGCTCAGATCCCATGTTGCT	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
TFR2-1	3	<u>GCTGGGAACTTCCACACACT</u> TTATCACTCACCTGATTTCCAA	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
TLR1/6/10-1	8	<u>CAGCAAGTGGTTCCAAATGA</u> GACCCCTAGCCTGAGAACCCT	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
TLR1/6/10-3	8	<u>AGGCGTTAGGACTTCAGCAT</u> CATGACTTCACACATCCAGCA	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
TLR2-1	8	<u>CCCCAGGTCATATGTTCCAT</u> ATGGCATGGTCCAGAGAGTT	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
TLR2-5	8	<u>CTCCAATTCGACCCCTAGC</u> GCGGGGTGGTTATTCTTTCT	1	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
TLR3-1	15	<u>AAACATATAAAGCAGCCAGCA</u> AAAGTCCTGATACACACATGGA	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
TLR4-1	1	<u>AGCAGCCCAAAGAAATAGCA</u> AGGAAACTAAGCCCAAGGA	1	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
TLR7/8-2	X	<u>TTTGCCACATCTGCTTTATCA</u> GGCAGGGTCCTTGTCTTAG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
TLR9-1	13	<u>CGATGGGAGCCTCTCTGA</u> CTGTTGCTGCTAGGTGGAG	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
TNF	7	<u>CTGGTCAGCCCAAGATTT</u> GGGGAAATGAGAAGTGTGAA	1	J	60°	0.2	24	01:16	single	14
TNFRSF11B-3	4	<u>TGAAGCCATCAGCTAGTCTCAA</u> GGTCTGACCTTTTCAAACACA	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
TNFRSF12A-6n	3	<u>CACATGGCACTCAAAGTGGT</u> CTTGAGTAGTGGGAGGCAAA	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
TNFRSF1A	5	<u>ACCTATCCTTCGTCCTGGC</u> CAGCCACTTACCTGGTGTACT	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
TNFRSF1B	1	<u>GAGATTCCTGGCTGTTACC</u> ACTGGCTGACATGGGTTCTC	1	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
Tyk2-2	2	<u>GGAACTCCTAACCCCTGAA</u> CCGATTTGATTCAACCCCTA	2	N	60°	0.2	24	01:16	single	14
Tyk2-4	2	<u>TGGTCAGGGAACTTCCACAT</u> CCTGCCTAAGCCACATTTTG	2	N	65°	0.2	24	01:16	single	14
Y205-2	8	<u>AAGGTTTTGCATTCAGGCTG</u> TTCAATCATAAATGCACTTGC	1	J	60°	0.2	24	01:16	48	17

MS, Mikrosatellitenmarker; SSC, *Sus scrofa* chromosome

MS in kursiver Schrift = Primersequenzen wurden anhand der Datenbankeinträge selbst entwickelt

FS, Farbstoff 1= DY-781; Farbstoff 2= DY-681

Ref., Referenz, siehe Tabelle Referenzen für Anhang

I, Informativität; N = nein, J = ja

AT, Annealingtemperatur in °C

K, Primerkonzentration je Forward und Reverse in µM

Verd., Verdünnungsstufe des PCR-Amplifikats mit Auftragspuffer für die Gelelektrophorese

M-plex, Multiplex, Primerpaare wurden im Rahmen einer Multiplex-PCR oder einzeln (single) eingesetzt

\* Marker war informativ, aber nicht Teil der QTL-Berechnungen;

\*\* im Rahmen dieser Studie mit vorangehendem Verbundprojekt Fugato IRAS zusammen entwickelte Marker

\*\*\* touch down PCR mit 8 Zyklen bei 70° C bzw. 65° C bzw. 63° C, 8 Zyklen bei 68° C bzw. 60° C bzw 59° C und 8 Zyklen bei 66° C bzw. 55° C

\*\*\*\* touch down PCR mit 9 Zyklen bei 70 °C, 8 Zyklen bei 68 °C und 8 Zyklen bei 66 °C

**Tabelle 14:** Liste der Multiplex-PCRs (M-Plex). Mikrosatellitenmarker (MS) wurden mit den jeweils aufgeführten Markern als Multiplex-PCR (M-Plex) bzw. Singleplex-PCR (single) amplifiziert. Die Nummerierung der Multiplex-PCRs entspricht der in Tabelle 13.

M-plex	MS 1	MS 2	MS 3	MS 4	MS 5
1	Sw886	Swr453			
2	S0025	Sw1979	Swr2157		
3	Sw18	Sw2074	Swr2480	SY1	
4	MN42	Swr1021			
5	IFNAR1	Sw552	Sw882		
6	S0533	Sw1984	Sw980*		
7	S0229	S0332			
8	S0385	Sw38*	Sw72		
9	KS156	Sw2052	Swc4		
10	S0282	Sw2470*	SY4		
11	CD40	Sw2456*	Sw395	Sw790	
12	DG93	S0391	Sw1515	Sw314	
13	S0320	Sw1460			
14	S0064	Sw2623	Sw963		
15	Sw1491	Sw1626	Sw413		
16	S0316	Sw1057	Sw1345		
17	Sw1083	Sw240	Sw2440	Sw344	
18	DG81	Sw1953			
19	Sw1920	Sw349	Sw745	Sw749	
20	DG79	S0073	Sw1369	Sw1980	Sw911
21	Sw2441	Sw742			
22	Sw1562	Sw301	Sw497		
23	S0036	Sw2443			
24	S0098	Sw1431			
25	S0026	Sw1081	Sw1708		
26	SE259162	Sw2431			
27	Sw1983	Sw2425	Sw2432		
28	S0035	Sw834	Swr308		
29	Sw2116	Sw830	Swr1101		
30	Sw1056	Sw2093			
31	DG33	KS111	Sw1482	Sw1879	
32	S0216	Swr345			
33	S0334	S0359	Sw2001*		
34	CD14	Swr1801*	SY19		
35	KS119	Sw1376	Sw1954	Swc27	
36	S0301	S0369	Sw2512		
37	Sw1073	Sw1701	Sw2559		
38	MP77	Sw1443	Sw288		
39	KS154	Sw1414	Sw1517		
40	S0298	Sw1564*	Sw2409		

M-plex	MS 1	MS 2	MS 3
41	DG50	Sw58	Swr1078
42	Sw13	Sw152	
43	Sw2021	Sw63	
44	SE47350	Sw2404	
45	S0070	Sw2019	
46	KVL1568	KVL2990	KVL6370
47	KVL3285	KVL4011	KVL5200
48	KS110	Y205-2	
49	Sw1071	Sw129	Sw1653*
50	Sw2532	Sw974	
51	Sw1631	Sw467	Swr1110*
52	KS150	Swr1998	
53	S0062	Sw1680	Sw864*
54	Sw1901	Sw1956	Swr85
55	Sw1380	ESTMS20	
56	Sw2043	S0212	
57	Sw1354	SJ001	
single	APR22		
single	S0101		
single	S0121		
single	S0143		
single	SE51018*		
single	Sw1378		
single	Sw2038		
single	Sw2130		
single	Sw2411		
single	Sw489		
single	Swr335		
single	Swr1004		
single	Swr312		
single	Swr414		
single	TNF		

---

**Literaturverzeichnis mit Quellenangaben für die Mikrosatellitenmarker aus Tabelle 13.  
Nummerierung ist entsprechend Tabelle 13.**

1. Alexander L.J., Troyer D.L., Rohrer G.A., Smith T.P., Schook L.B. & Beattie C.W. (1996a) Physical assignments of 68 porcine cosmid and lambda clones containing polymorphic microsatellites. *Mammalian Genome* 7, 368-72.
2. Alexander L.J., Rohrer G.A. & Beattie C.W. (1996b) Cloning and characterization of 414 porcine microsatellites. *Animal Genetics* 27, 137-48.
3. Archibald A.L., Haley C.S., Brown J.F., Couperwhite S., McQueen H.A., Nicholson D., Coppieters W., Weghe van de A., Stratil A., Winterø A.K., Fredholm M. & Larsen N.J (1995) The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa* ). *Mammalian Genome* 6, 157-75.
4. Berge T. (2008) Genomweite Kartierung von QTL zur Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber *Sarcocystis miescheriana* beim Schwein. Dissertationsschrift, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.
5. Brown J.F. & Archibald A.L. (1995) Two porcine microsatellite loci (S0033 and S0035). *Animal Genetics* 26, 277
6. Brown J.F., Hardge T., Rettenberger G. & Archibald A.L. (1994) Four new porcine polymorphic microsatellite loci (S0032, S0034, S0036, S0037). *Animal Genetics* 25, 365.
7. Campbell E.M., Fahrenkrug S.C., Vallet J.L., Smith T.P. & Rohrer G.A. (2001) An updated linkage and comparative map of porcine chromosome 18. *Animal Genetics* 32, 375-9.
8. Campbell E.M.G, Nonnemann D. & Rohrer G.A. (2003) Fine mapping a QTL affecting ovulation rate in swine on chromosome 8. *Journal of Animal Science* 81, 1706-14.
9. Coppieters W., Van de Weghe A., Peelman L., Depicker A., Van Zeveren A. & Bouquet Y. (1993) Characterization of porcine polymorphic microsatellite loci. *Animal Genetics* 24, 163-70.
10. Davies W., Høyheim B., Chaput B., Archibald A.L. & Frelat G. (1994) Characterization of microsatellites from flow-sorted porcine chromosome 13. *Mammalian Genome* 5, 707-11.
11. Dear D.V. & Miller J.R. (1994) Isolation of dinucleotide repeats from a pig chromosome 1-specific DNA library. *Mammalian Genome* 5, 649-51.

12. Ellegren H., Chowdhary B.P., Johansson M., Marklund L., Fredholm M., Gustavsson I. & Andersson L. (1994) A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics* 137, 1089-100.
13. Fredholm M., Winterö A.K., Christensen K., Kristensen B., Nielsen P.B., Davies W. & Archibald AL (1993) Characterization of 24 porcine (dA-dC)<sub>n</sub>-(dT-dG)<sub>n</sub> microsatellites: genotyping of unrelated animals from four breeds and linkage studies. *Mammalian Genome* 4, 187-92.
14. Fugato IRAS, im Rahmen dieser Studie mit vorangehendem Verbundprojekt Fugato IRAS (Entwicklung von genetischen Markern zur Infektabwehr und Resistenz im Atemtrakt des Schweins) zusammen entwickelte Marker
15. Grimm D.R., Goldman T., Holley-Shanks R., Bouen L., Mendiola J., Schook L.B., Louis C., Rohrer G.A. & Lunney J.K. (1997) Mapping of microsatellite markers developed from a flow-sorted swine chromosome 6 library. *Mammalian Genome* 8, 193-9.
16. Groenen M.A., Ruyter D., Verstege E.J., de Vries M. & van der Poel JJ (1995) Development and mapping of ten porcine microsatellite markers. *Animal Genetics* 26, 115-8.
17. Guo X.L., Xu N.Y., Looft C., Reinsch N. & Kalm E. (2004) Amplification of pig microsatellite markers using multiplex PCR (ch). *Yi Chuan* 26, 40-4.
18. Hu Z.-H., Park C.A., Fritz E.R. & Reecy J.M.(2010). QTLdb: A Comprehensive Database Tool Building Bridges between Genotypes and Phenotypes. Invited Lecture with full paper published electronically on The 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig, Germany August 1-6, 2010.
19. Johansson M., Ellegren H. & Andersson L. (1992) Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *Journal of Heredity* 83, 196-8.
20. Karlskov-Mortensen P., Hu Z.L., Reecy J.M. & Fredholm M. (2008) A data resource of 838 porcine microsatellite sequences with repeat motifs of three to six bases. *Animal Genetics* 39, 85-6.
21. Marklund L., Johansson Moller M., Høyheim B., Davies W., Fredholm M., Juneja R.K., Mariani P., Coppieters W., Ellegren H. & Andersson L. (1996) A comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig-Large White intercross. *Animal Genetics* 27, 255-69.
22. Mikawa S., Akita T., Hisamatsu N., Inage Y., Ito Y., Kobayashi E., Kusumoto H., Matsumoto T., Mikami H., Minezawa M., Miyake M., Shimanuki S., Sugiyama C.,

- Uchida Y., Wada Y., Yanai S. & Yasue H (1999) A linkage map of 243 DNA markers in an intercross of Göttingen miniature and Meishan pigs. *Animal Genetics* 30, 407-7.
23. Nsengimana J., Baret P., Haley C.S. & Visscher P.M. (2004) Linkage disequilibrium in the domesticated pig. *Genetics* 166, 1395-404
24. Petiot A. & Anderson Dear D.V. (1997) Two new polymorphic porcine microsatellites, S0533 and S0534. *Animal Genetics* 28, 458.
25. Riquet J., Milan D., Woloszyn N., Schmitz A., Pitel F., Frelat G. & Gellin J (1995) A linkage map with microsatellites isolated from swine flow-sorted chromosome 11. *Mammalian Genome* 6, 623-8.
26. Robic A., Dalens M., Woloszyn N., Milan D., Riquet J. & Gellin J. (1994) Isolation of 28 new porcine microsatellites revealing polymorphism. *Mammalian Genome* 5, 58-3.
27. Robic A., Parrou J.L., Yerle M., Goureau A., Dalens M., Milan D. & Gellin J (1995) Pig microsatellites isolated from cosmids revealing polymorphism and localized on chromosomes. *Animal Genetics* 26, 1-6.
28. Robic A., Milan D., Woloszyn N., Riquet J., Yerle M., Nagel M., Bonnet M., Pinton P., Dalens M. & Gellin J. (1997) Contribution to the physically anchored linkage map of the pig. *Animal Genetics* 28, 94-102.
29. Rohrer G.A., Alexander J.W., Keele J.W., Smith T.P. & Beattie C.W. (1994) A microsatellite linkage map on the porcine genome. *Genetics* 136, 231-45.
30. Rohrer G.A., Alexander L.J., Hu Z., Smith T.P., Keele J.W. & Beattie C.W. (1996) A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research* 6, 371-91.
31. Rohrer G.A., Vögeli P., Stranzinger G., Alexander L.J. & Beattie C.W. (1997) Mapping 28 erythrocyte antigen, plasma protein and enzyme polymorphisms using an efficient genomic scan of the porcine genome. *Animal Genetics* 28, 323-30.
32. Rohrer G.A., Stone R.T., Wang Z. & Troyer D (1998) Rapid communication: identification of two microsatellite loci that map to porcine chromosome 3. *Journal of Animal Science* 76, 1503-4.
33. Rohrer G.A., Fahrenkrug S.C., Nonneman D. & Warren W.C. (2002) Mapping microsatellite markers identified in porcine EST sequences. *Animal Genetics* 33, 372-6.
34. Ruyter D., Johansson M., Groenen M. & Andersson L. (1994) A porcine polymorphic microsatellite locus (S0098). *Animal Genetics* 25, 198.
35. Smith T.P., Rohrer G.A., Alexander L.J., Troyer D.L., Kirby-Dobbels K.R., Janzen M.A., Cornwell D.L., Louis C.F., Schook L.B. & Beattie CW (1995) Directed

- 
- integration of the physical and genetic linkage maps of swine chromosome 7 reveals that the SLA spans the centromere. *Genome Research* 5, 259-71.
36. Sonstegard T.S., Rohrer G.A. & Smith T.P. (1998) Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Animal Genetics* 29, 19-22.
  37. Wang Z., Rohrer G.A., Stone R.T. & Troyer D. (2000a) Isolation of thirty-one new porcine microsatellites from a microsatellite enriched microdissected chromosome 8 library. *Animal Biotechnology* 11, 33-43.
  38. Wang Z., Rohrer G.A., Stone R.T. & Troyer D. (2000b) Rapid communication: Twenty-six new porcine microsatellites from a microsatellite enriched microdissected chromosome 8 library. *Journal of Animal Science* 78, 3191-2.
  39. Wilke P.J., Jung M., Chen Y. & Geldermann H (1994): Porcine (GT)<sub>n</sub> sequences: structure and association with dispersed and tandem repeats. *Genomics* 21, 63-70.
  40. Zhao F., Miller L.M., Chardon P., Rogel-Gaillard C. & Louis C.F. (1999) Five new polymorphic microsatellite markers for pig chromosome 6p. *Animal Genetics* 30, 394-5.

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. habil Gerald Reiner, für die Überlassung des Themas, das Vertrauen und fortwährende Unterstützung. Ich bedanke mich sehr für die andauernde wissenschaftliche und vor allem auch für die statistische Betreuung. Vielen Dank für Ihre Geduld und Mühen.

Herrn Prof. Dr. habil Hermann Willems danke ich sehr für seine Hilfsbereitschaft, seine Ideen, sein bedingungsloses Engagement und die schöne Zeit im Labor.

Allen Mitarbeitern der Klinik für Schweine der Justus-Liebig-Universität, insbesondere Bettina Hopf und Ute Stoll, danke ich für die gute Zusammenarbeit und immer präsenste Hilfsbereitschaft.

Bei allen Mitgliedern des FUGATO-RePoRI-Projektes bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

All meinen Doktorandenkollegen und Mitstreitern, insbesondere Anna, Till und Christoph, danke ich für die tolle gemeinsame Zeit im Labor und darüber hinaus.

Meiner Familie danke ich für den Rückhalt und ihre uneingeschränkte Unterstützung in all meinen Lebenslagen.

Insbesondere danke ich dir, David. Ohne dich als Stütze, Hilfe und ohne deinen bedingungslosen Einsatz wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

## **Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Natalie Bertsch



*édition scientifique*   
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6513-3



9 783835 1965133

Photo cover: © dusanpetkovic1 @ fotolia.de