# Untersuchungen zur Assoziation von SNPs in Kandidatengenen auf SSC13 mit QTL für Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz beim Schwein

**Marleen Schwerdt** 



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.** 

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



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 2015

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 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen Printed in Germany





STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890 email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Schweine (Innere Medizin und Chirurgie) am Fachbereich Veterinärmedizin Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

# Untersuchungen zur Assoziation von SNPs in Kandidatengenen auf SSC13 mit QTL für Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz beim Schwein

**INAUGURAL-DISSERTATION** 

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

eingereicht von

# **Marleen Schwerdt**

Tierärztin aus Rüsselsheim

Gießen 2014

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. G. Reiner Prof. Dr. C. Ewers

Tag der Disputation: 05.12.2014

Meiner Familie

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 Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

# **Inhaltsverzeichnis**

| At                  | okürzungsverzeichnis  | Ι   |
|---------------------|---|-----|
| Ał                  | obildungsverzeichnis  | VI  |
| Tabellenverzeichnis |   | VII |
| 1.                  | Einleitung  | 1   |
| 2.                  | Literaturübersicht  | 3   |
|                     | 2.1 Genetische Krankheitsresistenz                          | 3   |
|                     | 2.1.1 Bedeutung der Krankheitsresistenz beim Nutztier       | 3   |
|                     | 2.1.2 Natürliche Krankheitsresistenzen bei Nutztieren       | 5   |
|                     | a. Trypanosomiasis beim Rind                                | 5   |
|                     | b. Nematodeninfektionen beim Schaf                          | 6   |
|                     | c. Marek`sche Krankheit beim Geflügel                       | 7   |
|                     | 2.1.3 Natürliche Krankheitsresistenzen beim Schwein         | 8   |
|                     | a. PRRSV  | 8   |
|                     | b. PrV  | 9   |
|                     | c. Escherichia coli   | 9   |
|                     | d. Salmonella sp.   | 10  |
|                     | e. Hämophilus parasuis                                      | 11  |
|                     | f. Sarcocystis miescheriana                                 | 11  |
|                     | g. Ascaris suum   | 12  |
|                     | 2.2 Genomanalyse  | 12  |
|                     | 2.2.1 Genomanalyse bei landwirtschaftlichen Nutztieren      | 13  |
|                     | 2.2.2 Genomkartierung                                       | 13  |
|                     | 2.3 Quantitative Merkmale und Quantitative Trait Loci (QTL) | 14  |
|                     | 2.3.1 QTL-Kartierung  | 15  |
|                     | 2.3.2 Genetical Genomics und eQTL                           | 18  |
|                     | 2.3.3 MAS und genomische Selektion                          | 19  |

| 2.4 Actinobacillus pleuropneumoniae                    | 21 |
|--|----|
| 2.4.1 Ätiologie  | 21 |
| 2.4.2 Klinik und Epidemiologie                         | 22 |
| 2.4.3 Relevanz   | 22 |
| 2.4.4 Natürliche Krankheitsresistenz gegenüber APP     | 22 |
| 2.4.5 Forschungsstand                                  | 23 |
| 2.5 Kandidatengene                                     | 23 |
| 2.5.1 AHSG   | 24 |
| 2.5.2 IL12A  | 26 |
| 2.5.3 MYD88  | 28 |
| 2.5.4 RUNX1  | 31 |
| 2.5.5 TF   | 33 |
| 2.5.6 TFRC   | 35 |
| Material und Methoden                                  | 38 |
| 3.1 Versuchstiere                                      | 38 |
| 3.2 Laborgeräte  | 39 |
| 3.3 Chemikalien  | 39 |
| 3.4 EDV-Programme und Datenbanken                      | 40 |
| 3.5 URL beim Download am 09.09.2012                    | 41 |
| 3.6 In silico-Recherche                                | 41 |
| 3.7 Auswahl der klinischen Phänotypen                  | 42 |
| 3.8 Auswahl der eQTL                                   | 43 |
| 3.9 Primerdesign                                       | 43 |
| 3.10 Primer  | 43 |
| 3.11 Photometrische Bestimmung der Primerkonzentration | 48 |
| 3.12 DNA-Extraktion                                    | 49 |
| 3.13 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration   | 49 |
| 3.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)                   | 49 |
| 3.15 Agarose-Gelelektrophorese                         | 50 |
| 3.16 Pyrosequenzierung                                 | 51 |
| 3.17 QTL-Analyse und Statistik                         | 55 |

3.

| 4. | Ergebnisse  | 56 |
|----|---|----|
|    | 4.1 Sequenzierung                                   | 56 |
|    | 4.2 Kopplungskarte von SSC13                        | 63 |
|    | 4.3 QTL-Analyse                                     | 64 |
|    | 4.4 Ergebnisse der QTL-Analyse                      | 65 |
|    | 4.4.1 Klinische Merkmale                            | 65 |
|    | 4.4.2 Cis-eQTL                                      | 66 |
|    | 4.4.3 $\Delta$ F-Werte unter Einbeziehung der SNPs  |    |
|    | als zusätzliche Marker in die QTL-Analyse           | 68 |
|    | 4.4.4 $\Delta$ CI-Werte unter Einbeziehung der SNPs |    |
|    | als zusätzliche Marker in die QTL-Analyse           | 69 |
|    | 4.4.5 $\Delta$ F-Werte unter Einbeziehung der SNPs  |    |
|    | in die QTL-Analyse als fixe Effekte                 | 71 |
|    | 4.4.6 $\Delta$ CI-Werte unter Einbeziehung der SNPs |    |
|    | in die QTL-Analyse als fixe Effekte                 | 72 |

| 5. | Diskussion  | 73 |
|----|---|----|
|    | 5.1 Kritische Betrachtung des Materials und der Methoden  | 73 |
|    | 5.1.1 Versuchstiere und F2-Ansatz                         | 73 |
|    | 5.1.2 Auswahl von SSC13 als zu untersuchendes Chromosom   | 74 |
|    | 5.1.3 Auswahl der Kandidatengene                          | 74 |
|    | 5.1.4 Auswahl der SNPs                                    | 76 |
|    | 5.1.5 QTL-Analyse   | 77 |
|    | 5.2 Klinische Merkmale                                    | 80 |
|    | 5.2.1 Respiratory Health Score der 50 am wenigsten und    |    |
|    | 50 am stärksten betroffenen Tiere                         | 80 |
|    | 5.2.2 Klinischer Score                                    | 81 |
|    | 5.2.3 Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeiten          | 81 |
|    | 5.2.4 Verhalten des QTL im Bereich des Transferrin-Gens   | 82 |
|    | 5.3 Cis eQTL  | 83 |
|    | 5.3.1 Einfluss des SNPs in MYD88 auf die UPK1B-Expression | 84 |
|    | 5.3.2 Einfluss des SNPs in MYD88 auf die RAB6B-Expression | 84 |

|    | 5.3.3 Einfluss weiterer SNPs auf die Expression |     |
|----|---|-----|
|    | der Cis-regulierten Gene                        | 85  |
|    | 5.4 Schlussfolgerungen                          | 86  |
|    | 5.5 Fazit                                       | 86  |
|    |   |     |
| 6. | Zusammenfassung                                 | 88  |
| 7. | Literaturverzeichnis                            | 91  |
| 8. | Danksagung                                      | 128 |

# I. Abkürzungsverzeichnis

| AFLP  | Amplified Fragment Length Polymorphism                                |
|-------|---|
| AML   | Akute Myeloische Leukämie   |
| ANOVA | Analysis of Variance  |
| APP   | Actinobacillus pleuropneumoniae                                       |
| BALF  | Bronchoalveoläre-Lavage-Flüssigkeit                                   |
| BC    | Backcross   |
| BMELV | Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz |
| bp    | Basenpaare  |
| CBF   | Core-Binding-Factor   |
| CD    | Cluster of Differentiation  |
| CI    | Konfidenzintervall  |
| CIM   | Composite Interval Mapping  |
| сM    | centiMorgan   |
| CpG   | Cytosin-Phosphat-Guanin   |
| DE    | Deutsches Edelschwein   |
| DL    | Deutsche Landrasse  |
| DNA   | Desoxyribonucleic Acid  |
| eQTL  | expression Quantitative Trait Locus                                   |
| FPD   | Family Platelet Disorder  |

| GEBV    | Genomic Estimated Breeding Value   |
|---------|--|
| Hb      | Hämoglobin   |
| IFNAR1  | Interferon (alpha, beta, omega)-Rezeptor 1   |
| Ig      | Immunglobulin  |
| IRAK    | Interleukin1-Rezeptor-Associated-Kinase  |
| L0H1    | Respiratory Health Score der 50 am stärksten und 50 am wenigsten betroffenen Tiere |
| LOD     | Logarithm of the Odds  |
| LPS     | Lipopolysaccharide   |
| LR      | Landrasse  |
| LR      | Likelihood Ratio   |
| LW      | Large White  |
| MA-BLUP | Marker Assisted Best Linear Unbiased Prediction                                    |
| MAP     | Mitogen-activated Protein Kinase   |
| MAS     | Marker-assisted Selection  |
| MDV     | Marek`s Disease Virus  |
| МНС     | Major Histocompatibility Complex   |
| mRNA    | messenger Ribonucleic Acid   |
| NAD     | Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid   |
| NCBI    | National Center for Biotechnology Information                                      |
| NFAT    | Nuclear Factor of Activated T-cells  |

| NFκB  | Nuclear Factor Kappa-light chain enhancer of activated B-Cells |
|-------|--|
| OMP   | Outer Membrane Proteine  |
| p.a.  | per annum  |
| PAMP  | Pathogen-Associated Molecular Pattern                          |
| PCR   | Polymerase Chain Reaction                                      |
| PRR   | Pseudorabies-Virus-Rezeptorprotein                             |
| PRRSV | Porcines Reproduktives und Respiratorisches Synzytial-Virus    |
| PrV   | Pseudorabies-Virus   |
| QTL   | Quantitative Trait Locus                                       |
| QTN   | Quantitative Trait Nucleotide                                  |
| RFLP  | Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus                    |
| RHS   | Respiratory Health Score                                       |
| RM 1  | Rekombinantes Marek`s Disease Virus 1 (Klon)                   |
| SeRi  | Sektionsscore/Reisolierungsscore                               |
| SIM   | Simple Interval Mapping  |
| SLE   | Systemischer Lupus Erythematodes                               |
| SNP   | Single Nucleotide Polymorphism                                 |
| SSC   | Sus Scrofa Chromosome  |
| STAT1 | Signal Transducer and Activator of Transcription 1             |
| TbP   | Transferrin-bindendes Protein                                  |
| TIR   | Toll-Interleukin1-Rezeptor                                     |

| TLR              | Toll-like-Receptor   |
|------------------|--|
| TNFα             | Tumor-Necrosis-Factor α  |
| TRAF             | Tumor-Necrosis-Factor-Receptor-Associated Factor                             |
| UTR              | Untranslated Region  |
| V(E)             | Umweltbedingte Varianz   |
| V(G)             | Genotypische Varianz   |
| V(P)             | Phänotypische Varianz  |
| ZOO-FISH         | Fluorescent In-Situ Hybridization zwischen Chromosomen verschiedener Spezies |
| ZWS              | Zuchtwertschätzung   |
| <u>Genkürzel</u> |  |
| AHSG             | α2-Heremans-Schmid Glycoprotein  |
| Apo L1           | Apolipoprotein L1  |
| DRB1             | Major Histocompatibility Complex DR beta Chain 1                             |
| FUT 1            | Fucosyltransferase 1   |
| GH 1             | Growth Hormone 1   |
| HFE              | High Iron Fe   |
| IFNy             | Interferon y   |
| IGF 2            | Insulin-like Growth Factor 2   |
| IL12A            | Interleukin 12A  |
| IRF 7            | Interferon Regulatory Factor 7   |
|                  |  |

| IRG 1  | Immune Responsive Gene 1                         |
|--------|--|
| LY 6E  | Lymphocyte Complex Antigene 6                    |
| MUC4   | Mucin 4  |
| MYD88  | Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88 |
| RAB6B  | Ras-related Protein 6B                           |
| RUNX1  | Runt-related Transcription Factor 1              |
| SORF 2 | Short Open Reading Frame 2                       |
| TF     | Transferrin                                      |
| TFRC   | Transferrin-Rezeptor                             |
|        |  |

UPK1B Uroplakin 1B

# II. Abbildungsverzeichnis

| Abb. 1  | Genetical Genomics-Prinzip  | 19 |
|---------|---|----|
| Abb. 2  | Anheftung eines Desoxy-nukleosid-triphosphats an den DNA-Strang<br>und Abspaltung eines Pyrophosphats | 54 |
| Abb. 3  | Reaktion von Pyrophosphat mit 5`-Adenosin-Phosphosulfat zu<br>Adenosin-Triphosphat und Schwefeloxid   | 54 |
| Abb. 4  | Entstehung von Licht  | 54 |
| Abb. 5  | Aufspaltung der übrigen Desoxy-nukleosid-triphosphate durch   |    |
|         | das Enzym Apyrase   | 55 |
| Abb. 6a | Übersicht für AHSG  | 56 |
| Abb. 6b | Übersicht für IL12  | 57 |
| Abb. 6c | Übersicht für MYD88   | 58 |
| Abb. 6d | Übersicht für RUNX1   | 59 |
| Abb. 6e | Übersicht für TF  | 60 |
| Abb. 6f | Übersicht für TFRC  | 61 |
| Abb. 7a | Lage der verwendeten, informativen Marker auf SSC13   | 63 |
| Abb. 7b | Lage der verwendeten, informativen und der neuen Marker auf SSC13                                     | 64 |
| Abb. 8  | $\Delta$ F-Werte  | 69 |
| Abb. 9  | $\Delta \operatorname{CI}$  | 70 |
| Abb. 10 | $\Delta$ F-Werte (Effekt)   | 71 |
| Abb. 11 | $\Delta$ CI (Effekt)  | 72 |

# III. Tabellenverzeichnis

| Tab. 1 | Phänotypen für die QTL-Analyse      | 42 |
|--------|-------------------------------------|----|
| Tab. 2 | Auflistung aller verwendeten Primer | 43 |
| Tab. 3 | PCR-Programm                        | 50 |
| Tab. 4 | SNP-Übersicht                       | 62 |

#### 1. Einleitung

Actinobacillus pleuropneumoniae ist ein weltweit verbreiteter bakterieller Erreger von Lungenentzündungen beim Schwein (Sebunya und Saunders 1983). An Pleuropneumonie erkrankte Tiere bringen nicht nur wirtschaftlichen Schaden für den Erzeuger durch Medikamenteneinsatz, verringerte Mastleistung und erhöhte Abgangsraten mit sich, sondern werden auch häufig antibiotisch behandelt (MacInnes und Rosendal 1988; Straw et al. 1989; Schoder et al. 1993). Fleischproduzenten und behandelnde Tierärzte stehen gegenüber dem Verbraucher in der Verantwortung, was Tierwohl und Unbedenklichkeit des Fleisches hinsichtlich Infektionserregern und Antibiotikarückständen betrifft. Der Erforschung der genetischen Resistenz gegenüber Infektionskrankheiten kommt in diesem Kontext entscheidende Bedeutung zu, da sie die Grundlage für eine Selektion krankheitsresistenter Tiere liefert. Die QTL-Analyse stellt hierbei ein wichtiges Werkzeug für die Suche nach kausalen Zusammenhängen zwischen DNA-Polymorphismen und Phänotyp-Varianten dar. Unterschiede in der Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber Actinobacillus pleuropneumoniae sind bereits für die Rasse Hampshire und einige Populationen der Deutschen Landrasse bekannt, wobei Hampshire-Schweine signifikant resistenter als Schweine der Deutschen Landrasse sind (Höltig et al. 2009). Da die genetischen Grundlagen der Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz weitgehend unbekannt sind, ist das Ziel dieser Doktorarbeit, durch QTL-Analysen mithilfe von SNPs in ausgewählten Kandidatengenen einen nächsten Schritt in Richtung der genauen Darstellung interessierender Genombereiche zu machen. Durch eine Assoziationsanalyse sollen Beziehungen zwischen Kandidatengenen und Phänotyp näher charakterisiert werden. Dazu wurde folgende Fragestellung bearbeitet:

Ist eine Kartierung von in einer F2-Familie segregierenden QTL für *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Resistenz mithilfe von zusätzlichen SNPs in positionellen und funktionellen Kandidatengenen sinnvoll? Ist es möglich, mithilfe eines solchen Verfahrens auf ein die Resistenz beeinflussendes QTN schließen zu können?

## Zur Beantwortung dieser Fragen wurde folgende Vorgehensweise gewählt:

1. Auswahl eines geeigneten F2-Tiermodells aus im Merkmal *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Resistenz divergierenden Ausgangsrassen.

- Ermittlung positioneller und funktioneller Kandidatengene auf Grundlage bekannter QTL, deren Screening auf DNA-Polymorphismen und nachfolgende Auswahl informativer SNPs.
- Einsetzen dieser SNPs als zusätzliche Marker in eine QTL-Analyse, in einem zweiten Schritt Betrachtung dieser SNPs als fixe Effekte um etwaigen Einfluss auf den QTL zu validieren.
- 4. Statistische Auswertung der Ergebnisse der QTL-Analyse in den Szenarien SNP0Effekt0 (der SNP wird nicht berücksichtigt), SNP1Effekt0 (der SNP wird als zusätzlicher Marker berücksichtigt) und SNP0Effekt1 (der SNP wird als fixer Effekt betrachtet).

# 2. Literaturübersicht

#### 2.1 Genetische Krankheitsresistenz

Meilensteine der Forschung, wie die Entdeckung der Vererbungsregeln durch Mendel und knapp hundert Jahre später, die Analyse der DNA-Struktur durch Watson und Crick, lieferten die Basis für den rasanten Wissenszuwachs in der Genetik im späten 20 Jh. Die Einführung von DNA-Sequenzierungsmethoden durch Gilbert/Maxam und Sanger (1977) sowie die Entwicklung der PCR durch Mullis (1986) ebneten den Weg für die moderne Genomanalyse. Nach dem erfolgreichen Abschluss des Human Genome Projects 2003 sind unter anderem auch Entwürfe für die Genome von Pferd (Wade et al. 2009), Rind (Elsik et al. 2009) und Schwein (Groenen et al. 2012) entstanden. Dadurch, dass das Schweinegenom nun weitgehend sequenziert ist, bietet sich Genetikern und Tierzüchtern die Möglichkeit, im Kampf gegen Infektionskrankheiten auf molekularer Ebene anzusetzen. Dies ist notwendig, da in den seltensten Fällen eine Krankheit monogen bedingt ist (Reiner 2006). Einer phänotypischen Variation liegt im Regelfall ein komplexes Zusammenspiel aus vielen genetischen Faktoren und Umwelteffekten zugrunde (Graw 2010, S.481). Um die genetischen Komponenten eines solchen polygenen Erbgangs und damit den Grund für unterschiedliche Resistenz bzw. Empfindlichkeit von Tieren verschiedener Rassen gegenüber einem Pathogen entschlüsseln zu können, bedarf es quantitativer Analysen (Reiner 2008; Graw 2010, S.481).

#### 2.1.1 Bedeutung der Krankheitsresistenz beim Nutztier

Die Möglichkeit, mithilfe genetischer Informationen auf zugrundeliegende molekulare Mechanismen der Krankheitsresistenz schließen zu können, ist ein vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten (Reiner 2008).

Die Zucht krankheitsresistenter Tiere stellt laut Müller und Brem (1991) eine sinnvolle Ergänzung zu den klassischen Kontrollmethoden durch Medikamenten- und Vakzineneinsatz oder Quarantäne dar. Dies wird durch Betrachtung verschiedener Aspekte verdeutlicht:

*Tierschutz*. Dem Tier entstehen durch Krankheit Schmerzen, Leiden und Schäden. Krankheitsresistenz ist definiert als die Fähigkeit eines Tieres, die Invasion des Pathogens zu verhindern (Resistenz) oder zumindest mit geringeren klinischen Problemen und Leistungseinbußen, Mortalitätsraten und Qualitätsminderungen zu reagieren (Toleranz) (Roy und Kirchner 2000; FAO 2007, S.101). Krankheitsresistenten Tieren wird ergo entweder die Infektion an sich, zumindest aber ein gewisses Maß der Folgen dieser Infektion erspart.

*Ökonomie*. Es ist zu erwarten, dass krankheitsresistente Tiere für den Produzenten eine ökonomische Entlastung bedeuten. Verminderte Ausgaben für Therapie (Medikamente, Tierarztkosten) einerseits, geringere Abgangsraten, höhere Produktivität und Produktqualität andererseits, sind die wichtigsten Aspekte (Reiner 2008).

*Verbrauchererwartung.* Der Verbraucher erwartet unbelastete tierische Produkte von hoher Qualität, die in einer tierfreundlichen Weise produziert werden (Special Eurobarometer 2007). Unter tierfreundlichen Bedingungen werden dabei sowohl ein hohes Maß an Tiergesundheit als auch das Tierwohl berücksichtigende Haltungsbedingungen verstanden. Die Zucht krankheitsresistenter Tiere trägt zur Verbesserung des Gesundheitsstatus lebensmittelliefernder Tiere bei und ist damit ein geeignetes Mittel, um diesem Aspekt der Verbrauchererwartung Rechnung zu tragen (Pohlmeier und Van Eenennaam 2009).

Antibiotika-Resistenz. Der Einsatz von Antibiotika in Tierbeständen trägt, zusammen mit einer Reihe anderer Faktoren, zur Resistenzentwicklung und der Verbreitung von Resistenzgenen im Genpool der Pathogene bei (Khachatourians 1998; Mc Ewen und Fedorka-Cray 2002). Obwohl die Relevanz von Antibiotika für die Therapie bakterieller Infektionskrankheiten unumstritten ist, mahnen steigende Resistenzzahlen und das Auftreten multiresistenter Keime zur Vorsicht. In einer kanadischen Studie wurde bereits Ende der achtziger Jahre eine erhöhte Resistenz von Actinobacillus pleuropneumoniae gegenüber Spectinomycin und Chloramphenicol festgestellt (Vaillancourt et al. 1988). In der im Jahr 2014 erschienenen GERMAP-Erhebung des BMELV wird das Resistenzniveau von Actinobacillus pleuropneumoniae noch als "niedrig" bezeichnet, wobei hier 4-17 % Gentamicin- und 17-32 % Tetracyclin-resistente Stämme gefunden wurden. Gegenüber Ceftiofur resistente Stämme wurden erstmals 2013 identifiziert (GERMAP 2012). . Studien aus dem europäischen Ausland zeigen ebenfalls mittlere bis hohe Resistenzraten gegenüber den häufig eingesetzten Tetracyclinen auf (Pascu et al. 2010; Kucerova et al. 2011). Auch wenn die antibiotische Behandlung der Pleuropneumonie noch kaum eingeschränkt ist, kann die Erforschung der genetischen Grundlagen der Actinobacillus *pleuropneumoniae*-Resistenz zum Wissensfortschritt über die Pathogenese dieser Krankheit beitragen und so neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. Zudem auszugehen, ist davon dass bei krankheitsresistenteren Tieren die benötigten Antibiotikamengen deutlich reduziert werden können.

Bei vielen Nutztierarten liegen beachtliche Erfolge im Feld der genetischen Krankheitsresistenz vor. Die im Folgenden ausgeführten Erkenntnisse und ihre Nutzung in der Praxis stehen beispielhaft für den immensen Fortschritt, den die Erforschung der genetischen Grundlage der Resistenz eines großen Spektrums an Pathogenen bei allen Nutztierarten verzeichnen kann.

#### 2.1.2 Natürliche Krankheitsresistenzen bei Nutztieren

#### a. Trypanosomiasis beim Rind

Die durch Fliegen der Spezies Glossina übertragene Trypanosomiasis ist eine ökonomisch bedeutsame Protozoeninfektion, die die Rinderhaltung in weiten Teilen Afrikas erschwert (Noyes et al. 2011). Verschiedene nationale und internationale Organisationen fördern daher die Forschung in ihrem Ziel, eine erhöhte genetische Resistenz gegenüber Trypanosomen in der afrikanischen Rinderpopulation zu etablieren. Die Definition des Merkmals "Trypanotoleranz" ist nicht klar, meist wird darunter die Fähigkeit, in einem Trypanosomiasis-Gebiet ohne Chemotherapie zu überleben und produktiv zu bleiben verstanden (Murray et al. 1982, S. 2-3; Courtin et al. 2008). Hanotte et al. (2003) konnten mit einer F2-Studie aus einer Kreuzung aus trypanotoleranten N'Dama und trypanoempfänglichen Boran QTL auf insgesamt 18 Chromosomen kartieren, die verschiedene, mit Resistenz oder Empfänglichkeit assoziierte Phänotypen beeinflussen. Im Gegensatz zu Ergebnissen vorher an Mäusen durchgeführter QTL-Kartierungen (siehe Kemp et al. 1996; Iraqi et al. 2000) wurde hier auf das Vorkommen zahlreicher QTL mit jeweils geringem Einfluss auf die phänotypische Varianz geschlossen. An Knockout-Mäusen durchgeführte Studien von Campos et al. (2004) und Drennan et al. (2005) belegen, dass die Kontrolle der Trypanosoma-Infektion maßgeblich von der frühen Produktion proinflammatorischer Zytokine und Initiation einer Abwehrreaktion über den TLR-Signalweg via MYD88 abhängt. Für die nähere Zukunft hat sich ein Konsortium von Wissenschaftlern verschiedener anglo- amerikanischer Universitäten zum Ziel gesetzt, im Rahmen des "Chuma Cow Projekts" transgene Rinder zu erzeugen (Willyard 2011). Bei dem Transgen handelt es sich um Pavian-ApoL1, das beim Menschen für eine Resistenz gegen drei Trypanosoma-Spezies und bei Pavianen für eine

Resistenz sowohl gegen humanpathogene als auch rinderpathogene *Trypanosomen* verantwortlich ist (Lukeš und Raper 2010).

#### b. Nematodeninfektionen beim Schaf

Infektionen mit Nematoden, insbesondere der Familie Trichostrongylidae, sind weltweit für erhebliche Leistungsminderungen und Erkrankungen bei Hauswiederkäuern verantwortlich. Problematisch sind verbreitete Resistenzen gegenüber häufig eingesetzten Wirkstoffgruppen wie Benzimidazolen oder makrozyklischen Laktonen (Eckert et al. 2008, S. 548) Die Tierzucht bietet mit der Möglichkeit, auf erhöhte Resistenz gegenüber Nematodeninfektionen zu selektieren und entsprechende Tiere zu züchten eine vielversprechende Alternative zum Arzneimitteleinsatz. Resistenzunterschiede hinsichtlich Infektionen mit Rundwürmern sind für viele Schafrassen anhand zahlreicher Studien nachgewiesen. Unter anderem gelten die Rassen Shetland (Golding und Small 2009), Scottish Blackface (Abbott et al. 1984) und Rhönschafe (Gauly und Erhardt 2001), als besonders resistent, Merinoschafe (Abbott et al. 1984; Stear und Murray 1994), Romney Marsh (Mugambi et al. 1997) und Suffolk (Sayers et al. 2005) als empfänglicher. Am häufigsten wird das moderat vererbbare Merkmal FEC (Faecal Egg Count) zur Beurteilung von Resistenz/ Empfänglichkeit hinzugezogen (Dominik 2005). Auch hämatologische (Eosinophile) und serologische (IgA) Parameter korrelieren mit Resistenz (Stear und Murray 1994; Stear et al. 2009; Hein et al. 2010). Zwei mit FEC assoziierte QTL auf Chromosom 3 und Chromosom 20 (Coltman et al. 2001; Davies et al. 2006) wurden trotz unterschiedlicher Designs in den meisten Studien bestätigt. Kausative Mutationen sind noch nicht bekannt, die wahrscheinlichsten Kandidatengene sind DRB-1 auf Chromosom 20 (Sayers et al. 2005; Stear et al. 2009) und IFNy auf Chromosom 3 (Coltman et al. 2001; Dominik 2005; Stear et al. 2009). In Neuseeland und Australien existieren bereits öffentlich zugängliche Datenbanken, in der Züchter Böcke je nach Zuchtwert für FEC auswählen können (Sheep Improvement Ltd. und Sheep Genetics). Beide Länder sind weltweite Vorreiter für die Zucht auf Nematodenresistenz beim Hauswiederkäuer (Bisset et al. 2001).

An diesem Beispiel lässt sich erkennen, dass gut erfassbare phänotypische Merkmale auch ohne Kenntnis der kausativen Mutation für die Selektion auf krankheitsresistente Tiere geeignet sind. Als Äquivalent in der Schweinezucht ist die Halothan-Sensibilität zu nennen. Obwohl die zugrundeliegende Mutation des Ryanodin-Rezeptors erst 1990 entdeckt wurde,

wird schon seit den 70er Jahren mithilfe des Halothan-Tests auf stressresistente Schweine selektiert.

Eine Erforschung der genetischen Grundlage ist trotz Wirksamkeit der phänotypischen Selektion erstrebenswert, da mit der Möglichkeit eines Gentests Infektionsversuche bzw. Challenge-Tests, die das Tierwohl gefährden, überflüssig werden. Ein weiterer Vorteil liegt im Erkenntnisgewinn hinsichtlich der Pathogenese der Krankheiten, der wiederum zur Verbesserung von Medikamenten und Vakzinen genutzt werden kann.

#### c. Marek`sche Krankheit beim Geflügel

Die Marek'sche Krankheit (MD) wird durch ein Alpha-Herpesvirus hervorgerufen und zeichnet sich u. a. durch Immunsuppression und zur Metastasierung neigende Lymphome aus. Obwohl die Impfung mit Lebendvakzinen seit den 1970er Jahren weitverbreitet und auch effektiv ist (Churchill et al. 1969; Gimeno 2008), stellt MD weiterhin eine Bedrohung für die geflügelproduzierende Industrie dar. Weiterverbreitung trotz Vakzinierung, Anfälligkeit gegenüber opportunistischen Keimen und das Auftreten neuer, hochvirulenter, impfresistenter Stämme verdeutlichen die Notwendigkeit, Alternativen bzw. Ergänzungen zur Impfung in der Zucht auf genetisch resistente Tiere zu suchen (Witter 1998; Gimeno 2008). Die Heritabilität für MDV-Resistenz wird zwischen moderat (0,34; Vallejo et al. 1998) und hoch (0,61; Gavora und Spencer 1979) eingeschätzt, damit wären gute Voraussetzungen für die Zucht auf resistente Tiere gegeben. Als erster genetischer Marker assoziiert mit MD-Resistenz wurde das B21-Allel des MHC von Longenecker et al. (1976) identifiziert. Bacon und Witter (1993) untersuchten die Reaktion von Hühnern mit verschiedenen B-Haplotypen auf Vakzinierung mit Serotyp 1-3 und konnten deutliche Unterschiede in der Effektivität der Impfung feststellen. Trotz der wichtigen Rolle, die der MHC in der Resistenz gegenüber MD innezuhaben scheint, sind andere Autoren davon überzeugt, dass auch Polymorphismen in non-MHC Genen in hohem Maße zum Phänotyp beitragen. Die erste genomweite Studie zur Kartierung von non-MHC-QTL wurde von Vallejo et al. (1998) durchgeführt. Eine von Yonash et al. (1999) an derselben Versuchstierpopulation durchgeführte Studie mit höherer Markerdichte, QTL-Auflösung und Genomabdeckung verfeinerte und ergänzte die vorher gewonnenen QTL-Daten. Mit dem Ziel, auch in kommerziell genutzten Legehühnern mit Resistenz assoziierte Genomregionen zu finden, wurden zwei weitere QTL-Studien an White-Leghorn-Legehybriden gemacht (Mc Elroy et al. 2005; Heifetz et al. 2009). In den genannten Versuchen wurden zahlreiche QTL-Regionen identifiziert, wobei vier (auf Chr. 2/4/7/8)

wiederholt gefunden wurden. Da das virale SORF 2 im nicht-onkogenen MDV-Stamm RM1 nicht im vollen Ausmaß exprimiert wird, sind die interagierenden Wirtsproteine Kandidatengene für MD-Resistenz (Liu et al. 2001a). Da GH1 nicht nur mit SORF 2 interagiert, sondern auch seine Produktion in infizierten Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz nachweisbar ist, wurde es als potentielles Kandidatengen klassifiziert. Eine von den Forschern im Anschluss durchgeführte genomweite Assoziationsstudie in einer kommerziellen White-Leghorn Population zeigt eine deutliche Assoziation von GH1-Genotypen mit MD-Resistenz bei Tieren eines bestimmten MHC-Genotyps. Mit einem ähnlichen Ansatz wurde durch Liu et al. (2003) LY6E als zweites Kandidatengen identifiziert. Dieses Gen war eines von vier, die in MD-resistenten und MD-empfänglichen White Leghorn differentiell exprimiert wurden (Liu et al. 2001b). Später wurde diese Liste von anderen Forschergruppen um das Vitamin-D-Rezeptor Gen (Praslickova et al. 2008) und IRG1 (Smith et al. 2011) ergänzt. Die Vorgehensweise, Daten aus QTL Analyse, Expressionsanalyse und Protein-Protein-Interaktions-Assays zu kombinieren ist demnach vielversprechend und zur Identifikation von Kandidatengenen für Krankheitsresistenz geeignet.

### 2.1.3 Natürliche Krankheitsresistenzen beim Schwein

#### a. PRRSV

Tiere der Rasse Duroc stellten sich nach Infektion mit einem hochvirulenten PRRSV-Stamm als resistenter heraus als reinrassige Hampshire- oder Meishan-Schweine (Halbur et al. 1998). Deutliche Rassenunterschiede bezüglich Dauer der Virämie und Viruslast nach einer experimentellen PRRSV-Infektion von Pietrain und Wiesenauer Minischweinen wurden von Reiner et al. (2010) beschrieben. Hinweise auf einen entscheidenden Einfluss der angeborenen Immunität auf die Schwere des Krankheitsverlaufes fanden sich in einer Studie an Tieren unterschiedlichen Alters (Klinge et al. 2009). Boddicker et al. konnten 2012 mithilfe einer genomweiten Assoziationsstudie einen markanten QTL auf SSC 4 lokalisieren, der bis zu 15% der Varianz in Viruslast und Gewichtsentwicklung erklärt.

#### b. PrV

Rasseunterschiede bezüglich der Stärke der Immunreaktion auf PrV-Antigen sind bereits durch in vivo und in vitro Studien festgestellt worden (Meeker et al. 1987; Edfors-Lilja et al. 1998). In einer F2-Familie, die durch Kreuzung der Founderrassen DE x Meishan erzeugt wurde, konnten Reiner et al. (2002b) erstmals QTL für mit PrV-Resistenz assoziierte Merkmale detektieren. Darunter zählten QTL für das Auftreten neurologischer Symptome (blieb bei Meishan aus) und QTL, die den Temperaturverlauf während der Infektion beeinflussten. Als mögliche Kandidatengene wurden u.a. das IFNγ-Gen als auch PRR1 und PRR2 (Rezeptorproteine) betrachtet (Reiner et al. 2002b).

#### c. Escherichia coli

In einer richtungsweisenden Studie konnten Bertschinger et al. (1993) die Hypothese bestätigen, wonach Resistenz gegen F18-tragende E. coli durch einen Einzellocus bestimmt wird, der sich bezüglich Empfindlichkeit rezessiv verhält. Mithilfe einer Analyse der Sequenz und der Kopplungseigenschaften der positionellen Kandidatengene FUT1 und FUT2 konnten Meijerink et al. (1997) zwei SNPs im FUT1-Gen identifizieren, die in starkem Kopplungsungleichgewicht zu dem Resistenz-verursachenden Locus stehen. In einer weiteren Studie konnte ein Zusammenhang zwischen einem Aminosäure-Austausch im FUT1-Genprodukt und der Bindungsfähigkeit von E. coli F18-Fimbrien an die Darmepithelzellen hergestellt werden (Meijerink et al. 2000). Ein molekulargenetischer Test zur Unterscheidung von FUT1-Genvarianten basierend auf RFLP-Markern ist seit den 90er Jahren bekannt (Vögeli et al. 1997; Vögeli und Bertschinger 1999). Der Gentest auf E. coli F18-Resistenz wird z.B. im Zuchtprogramm der Pig Improvement Company Ltd. in den USA standardmäßig angewendet. Auch die Forschung zur genetischen Resistenz gegenüber F4-tragenden E. coli ist bereits weit fortgeschritten. Grundlegende Erkenntnisse, wie die Existenz zweier Phänotypen ("positiv" und "negativ" entsprechend adhäsiv und nicht-adhäsiv) und Hinweise auf einen zugrundeliegenden, klassischen Mendel'schen Erbgang finden sich bereits bei Sellwood et al. (1975) und Rutter et al. (1975). Gibbons et al. (1977) bestätigten, dass das mit Resistenz assoziierte Allel autosomal rezessiv vererbt wird und nahmen eine Verlinkung mit dem Transferrin-Gen auf SSC13 an. Das Resistenz-verursachende Gen wurde durch Guerin et al. (1993) und Edfors-Lilja et al. (1995) ebenfalls auf SSC13 lokalisiert. Hinsichtlich der Feinkartierung und der Benennung von Kandidatengenen für die beobachteten

Resistenzunterschiede finden sich teilweise unterschiedliche Angaben in der Literatur, eine kausative Mutation ist bisher noch nicht identifiziert (Jørgensen et al. 2003; Peng et al. 2007; Niu et al. 2011; Rampoldi et al. 2011; Fu et al. 2012). Seit 2004 ist es mit dem von Jørgensen entwickelten Gentest auf verschiedene Polymorphismen im Bereich des MUC4-Gens möglich, auf Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber F4-tragenden *E. coli* zu selektieren. Dieser Test wird in Selektionsprogrammen in dänischen Herden angewendet (Jacobsen et al. 2010). Zur MAS stehen sowohl ein direkter (F18) als auch ein indirekter Marker (Linkage-Disequilibrium-Marker, F4) zur Verfügung (Dekkers 2004).

#### d. Salmonella sp.

Salmonellen sind die wichtigste Ursache infektiöser Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts des Menschen in Deutschland (Tschäpe und Bockemühl 2002). Im Jahr 2012 wurden ca. 20000 Salmonellose-Fälle beim Menschen in Deutschland gemeldet (RKI 2012). Die am häufigsten auftretenden, nicht-wirtsspezifischen Serovare S. Enteritidis und S. Typhimurium (Gericke et al. 1999), die in ca. 80% aller Erkrankungen die Ursache darstellen, persistieren innerhalb der Nutztierpopulationen und werden über kontaminierte tierische Lebensmittel übertragen (Tschäpe und Bockemühl 2002). Laut einer Erhebung der European Food Safety Authority lassen sich 10-20% aller humanen Salmonellosen in Europa auf den Konsum von Schweinefleisch und Schweinefleischprodukten zurückführen (EFSA 2010). Dem Schwein kommt daher, neben Geflügel und Rind, als einer der Hauptwirte für Enteritis-auslösende Salmonellen eine wichtige Rolle in der Infektionskette zu. Insbesondere die Salmonella-Prävalenz bei Endmastschweinen beeinflusst die Lebensmittelsicherheit (Van der Wolf et al. 1999). Dass natürliche Resistenzen gegenüber Salmonella innerhalb einiger Schweine-Populationen vorliegen, konnte Van Diemen et al. (2002) mithilfe einer zu diesem Zweck erstellten F2-Familie nachweisen. In Zusammenhang mit einer S. Choleraesuis-Infektion wurden Unterschiede in Zahl und Funktion polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten und der humoralen Immunantwort festgestellt, die mit der Schwere der Infektion assoziiert waren (Van Diemen et al. 2002). In einem Versuch, die S. Choleraesuis-Resistenz beeinflussende Chromosomenregionen zu identifizieren, nutzten Galina-Pantoja et al. (2009) AFLP-Marker, wodurch Regionen auf sechs Chromosomen, die signifikant mit bakterieller Besiedlung der Milz und/oder der Leber assoziiert waren, identifiziert wurden. Uthe et al. (2011) sowie

Shinkai et al. (2011) konnten zudem eine Reihe von SNPs mit *Salmonella*-Resistenz beim Schwein in Zusammenhang bringen.

### e. Haemophilus parasuis

Haemophilus parasuis spielt als Erreger der Glässer'schen Krankheit eine wichtige Rolle in der Ferkelaufzucht (Blanco et al. 2008). Bei einer systemischen Infektion werden vorwiegend seröse Körperoberflächen befallen, was sich als Polyserositis, -arthritis und Meningitis äußern kann (Vahle et al. 1995; Zimmerman et al. 2012). Haemophilus parasuis kann die Lunge sowohl als primäres als auch als sekundäres Pathogen besiedeln und nachfolgend eine Pneumonie auslösen (Cuesta Gerveno et al. 2013). Durch mehrere Studien wurde das Zusammenwirken von Haemophilus parasuis mit anderen Erregern bei der Pathogenese einer Lungenentzündung belegt. Hierzu zählen PRRSV (Solano et al. 1997; Yu et al. 2012), PrV (Narita et al. 1994) und Bordetella bronchiseptica (Brockmeier 2004). Sowohl kommerzielle Schweinepopulationen als auch Wildschweine sind von der Glässer`schen Krankheit betroffen (Cuesta Gerveno et al. 2013). Durch einen Infektionsversuch mit Ferkeln unterschiedlicher väterlicher Abstammung konnten Blanco et al. (2008) signifikante Unterschiede in der Resistenz gegenüber Haemophilus parasuis feststellen. In dieser Studie erwiesen sich ca. 10% der untersuchten Tiere als komplett resistent und zeigten weder klinische Symptome noch eine bakterielle Besiedlung der Lunge (Blanco et al. 2008). Zur weiteren Aufklärung der genetischen Basis der Resistenz führten Wilkinson et al. (2010) eine Genexpressionsanalyse an zuvor mittels Microarray als "resistent" oder "empfänglich" klassifizierten Tieren durch, bei der vor allem Gene mit Bedeutung für die Antigen-Präsentation und mit antiviraler Abwehr assoziierte Gene bei empfänglichen Tieren differentiell exprimiert waren.

#### f. Sarcocystis miescheriana

Mithilfe eines Pathogen-Wirt-Modells am Beispiel einer experimentellen *Sarcocystismiescheriana* Infektion wurde von Reiner et al. (2007b) die erste QTL-Studie zur Parasitenresistenz beim Schwein vorgestellt. In einem Infektionsversuch mit Tieren der Rassen Pietrain und Meishan wurden zunächst verschiedenste klinische und parasitologische Merkmale evaluiert. Deutliche Rassenunterschiede innerhalb einiger quantitativer Merkmale wiesen auf eine genetische Basis der erhöhten Resistenz von Schweinen der Rasse Meishan gegenüber Pietrain hin (Reiner et al. 2002a). In einer 139 Tiere umfassenden F2-Familie wurden insgesamt 14 genomweit signifikante QTL gefunden, darunter QTL mit erheblichen Effekten auf die Bradyzoitenzahl und die IgG2-Spiegel (Reiner et al. 2007b). In einer weiteren Studie an der gleichen Versuchstierpopulation wurden von Broke et al. (2011) zwei Intron-SNPs im IRF7-Gen entdeckt, von denen einer mit erhöhter Krankheitsresistenz gegenüber *Sarcocystis* assoziiert zu sein schien.

#### g. Ascaris suum

Die durch Nejsum et al. (2009) festgestellte hohe Heritabilität für Resistenz-assoziierte Merkmale wie Faecal Egg Count und Wurmbürde lassen auf einen hohen genetischen Einfluss auf die Anfälligkeit gegenüber dieser Parasitose schließen. Die Existenz eines mit der *A. suum* Wurmbürde assoziierten QTL auf SSC 4 wurde durch eine 2012 publizierte Studie von Skallerup et al. (2012) postuliert, nachdem mithilfe von kommerziellen SNP-Chips das komplette Genom gescannt worden war .

#### 2.2 Genomanalyse

Seit der Domestikation der ersten Nutztiere vor ca. 10000 Jahren ergreift der Mensch die Gelegenheit, durch die Auswahl der zu verpaarenden Elterntiere ein oder mehrere erwünschte Merkmale in den nachfolgenden Generationen zu verbessern. Bis in die 1950 er Jahre beruhte diese Selektion rein auf phänotypischen Kriterien, da die zugrundeliegende Genetik unbekannt war (Thompson 2009). Obwohl sich auch auf diese Weise ein Zuchtfortschritt erreichen lässt, kann das eigentliche Potenzial, das in der Kreuzung zweier diploider Organismen steckt, erst mit dem Wissen um die genetischen Grundlagen voll ausgeschöpft werden. Deren Erforschung erfolgt im Zuge der Genomanalyse.

#### 2.2.1 Genomanalyse bei landwirtschaftlichen Nutztieren

Unter Genomanalyse versteht man die Betrachtung der gesamten genetischen Information eines Individuums. Bei der strukturellen Genomanalyse soll die genetische Variation, die einem Phänotyp zugrundeliegt, auf DNA-Ebene identifiziert werden (Schwerin et al. 2006). Die funktionelle Genomanalyse dagegen betrachtet die Expression von Genen im Kontext mit unterschiedlicher Merkmalsausprägung, wobei auch Umweltfaktoren berücksichtigt werden müssen (Schwerin et al. 2006). Unterscheidbar sind hier "Transcriptomics" und "Proteomics", je nachdem ob sich auf die Gesamtheit der mRNA oder der Proteine bezogen wird (Hegde et al. 2003). Beides dient dazu, die Entstehung eines Phänotyps bei Vorliegen eines bestimmten Genotyps nachvollziehen zu können. Das Ziel der Genomanalyse liegt also darin, Gene und deren Allele, die der phänotypischen Variation in einem Leistungs,- oder Gesundheitsmerkmal zugrundeliegen, zu identifizieren. Dieses Wissen bietet folgende Vorteile:

- Träger "günstiger" und "ungünstiger" Allele können durch Gentests identifiziert werden.
  Dies dient der Vorselektion, so dass die eigentliche Leistungsprüfung mit weniger Tieren stattfinden kann (Fugato 2004).
- Erkenntniszuwachs bei der Erforschung von physiologischen und pathologischen Prozessen und Signalwegen, die an der Entstehung des Merkmals beteiligt sind.

#### 2.2.2 Genomkartierung

Die Genomkartierung ist die "Identifizierung von Positionen (...) in einem DNA Molekül" (...) und "die Messung von Abständen zwischen einzelnen Positionen" (Geldermann 2005, S. 270). Die Ergebnisse der Genomkartierung werden in Genkarten dargestellt, diese sind ein grundlegendes Werkzeug für die Genomanalyse. Nach Hu (2009) sind drei Arten von Genkarten unterscheidbar.

 Genetische Karten (Kopplungskarten): Bei der genetischen Kartierung wird die Position eines betrachteten Markerlocus relativ zu flankierenden Loci bestimmt. Diese Distanz wird in Rekombinationseinheiten (cM) angegeben (Morton 2003). Ein cM entspricht einer Rekombination pro 100 Meiosen und ist ein Maß für die Kopplung zwischen zwei Loci. Die Rekombinationsraten werden zuvor durch eine Kopplungsanalyse mit Ermittlung des LOD-Scores geschätzt und mithilfe von Kartierungsfunktionen (z.B. nach Haldane, nach Kosambi) in die Kartierungseinheit centiMorgan umgerechnet. Voraussetzung für das Erstellen einer Kopplungskarte ist das Vorhandensein von informativen Markern, die gleichmäßig über das Genom verteilt sind. Marker sind "spezifische DNA-Variationen zwischen Individuen" (van Eenennaam 2008), dies bedeutet es existieren unterschiedliche Allele. Man unterscheidet Typ I und Typ II Marker, je nachdem ob der Locus in oder in unmittelbarer Nähe zur codierenden Sequenz des betrachteten Gens liegt oder sich in nicht-codierender Sequenz befindet (O'Brien 1991). Die ersten Kopplungskarten für das Schweinegenom wurden von Archibald et al. (1995) und Rohrer et al. (1996) veröffentlicht.

- Physikalische Karten: Im Gegensatz zur genetischen Karte, aus der sich die relativen Abstände zwischen Loci ergeben, werden bei der physikalischen Kartierung die absoluten Distanzen entlang des Chromosoms gemessen. Diese werden in Basenpaaren bzw. Nukleotiden angegeben. 2012 wurde der erste vollständige Entwurf einer physikalischen Karte des Schweinegenoms fertiggestellt (Groenen et al. 2012).
- 3. Komparative Karten: Bei der vergleichenden Kartierung werden evolutionär konservierte, homologe Gene und/oder ganze Segmente auf den Chromosomen unterschiedlicher Spezies lokalisiert (Eppig 1996). Ebenfalls untersucht wird die Kopplung zwischen Loci, deren Ausmaß umso höher ist je später die betrachteten Spezies im Zuge der Evolution divergierten (Nadeau und Sankoff 1998). Die komparative Kartierung ist einerseits bei der Übertragung von Erkenntnissen hinsichtlich Erbkrankheiten oder Mutationen und bei der Suche nach dem verantwortlichen Gen hilfreich, andererseits lassen sich Rückschlüsse auf die Verwandtschaft von Arten und die Rearrangierung von Genmaterial während der Entwicklung der betrachteten Spezies ziehen. Eine Möglichkeit der Darstellung homologer Bereiche bieten mithilfe von ZOO-FISH erstellte Übersichten, ein Beispiel für eine komparative Karte von porcinen und humanen Chromosomen findet sich bei Frönicke et al. (1996).

#### 2.3 Quantitative Merkmale und Quantitative Trait Loci (QTL)

Das Merkmal "Krankheitsresistenz" wird polygen vererbt, d.h. der Phänotyp ist das Resultat aus dem Zusammenwirken von zwei oder mehr Genen und von Umweltfaktoren (Tanksley 1993). Diese Polygenie bewirkt, dass die Ausprägung des Merkmals innerhalb der untersuchten (hypothetischen) Population kontinuierlich, dementsprechend normalverteilt ist (Falconer und Mackay 1996, S.102). Ein QTL (Quantitative Trait Locus) ist ein Genlocus, dessen Varianten zu unterschiedlichen Messwerten bei einem multifaktoriellen, quantitativen Merkmal führen (Geldermann 1975). Die QTL-Kartierung ist als eine Erweiterung der genetischen Kartierung anzusehen (Geldermann 1975), wobei DNA-Marker als Fixpunkte auf der DNA dienen. Durch Messung der relativen Abstände zwischen Markern lässt sich eine Kopplungskarte erstellen. Diese genetischen Karten sind mittlerweile für zahlreiche Spezies verfügbar. Die Einheit der genetischen Rekombination (cM: centiMorgan) gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der zwischen zwei Loci während der Meiose ein Crossing Over stattfindet. Ein Centimorgan entspricht hierbei einer Rekombinationshäufigkeit von 1 % (s.o.). Eine Reduktion der Markerabstände auf unter 20 cM trägt in der Regel kaum zu einer Verbesserung der Power für die QTL-Detektion bei (Darvasi et al. 1993; Weller 2009, S.145). Zur Identifizierung einzelner Genorte, die mit geringen Einzeleffekten an der Ausprägung quantitativer Merkmale beteiligt sind, wird jedoch eine hohe Auflösung von 1-2 cM benötigt (Cox Matise et al. 1994; Rohrer et al. 1996). Die Unterscheidung, ob ein QTL durch den Effekt eines Einzelgens oder die Effekte mehrerer, eng gekoppelter Gene hervorgerufen wird, ist je nach erreichter Auflösung schwierig bis nahezu unmöglich (Zeng 2005). Um die Lokalisation des QTL genauer zu bestimmen und die Anzahl der positionellen Kandidatengene zu verringern, kann eine Feinkartierung des auffälligen Genomabschnittes durchgeführt werden. Im nächsten Schritt werden diejenigen Gene ausgewählt, die aufgrund ihrer Funktion am wahrscheinlichsten an der Ausprägung des betrachteten Merkmals beteiligt Durch aufgefundene Polymorphismen sind. Sequenzierung können mittels Assoziationsanalyse auf einen Zusammenhang mit der Variation in der Merkmalsausprägung getestet werden. Die beiden Hauptansätze zur Identifizierung von merkmalsbeeinflussenden Loci, Genome Scan und Assoziationstests mit Kandidatengenen (Andersson 2001), können so kombiniert werden.

## 2.3.1 QTL-Kartierung

Die QTL-Kartierung nutzt statistische Beziehungen zwischen molekularen Markern und komplexen Merkmalen. Genotypische und phänotypische Daten dienen dazu, die genetische Grundlage, die eine Variation in einem quantitativen Merkmal zur Folge hat, aufzuklären (Falconer und Mackay 1996, S.361).

Das Ziel der QTL-Analyse ist, die Anzahl und die Lage der beteiligten Loci herauszufinden und möglichst die dem QTL zugrundeliegenden Gene und ihre Varianten zu identifizieren (Borevitz und Chory 2004). Anders gesagt liefert die QTL-Analyse positionelle Kandidatengene für die Variation in einem bestimmten Merkmal. Ist die kausale oder eine eng mit ihr verlinkte Mutation bekannt, können diese Informationen über MAS direkt in Zuchtprogrammen genutzt werden (Andersson 2001). Voraussetzungen zum Durchführen einer QTL-Analyse sind (Mauricio 2001; Miles und Wayne 2008):

### 1. Informative Marker, vorhandene Kopplungskarten

Ein Prinzip der QTL-Analyse ist, auf das Vorliegen von bestimmten QTL-Allelen aufgrund von bekannten, mit ihnen gekoppelten Markerallelen schließen zu können. Dies ist möglich, wenn sich QTL und Markerlocus im Kopplungsungleichgewicht befinden, das heißt, cosegregieren (Kearsey 1998) und der Marker innerhalb der betrachteten Population informativ ist. Die Informativität des Markers ist quantifizierbar durch den sog. PIC-(Polymorphism Information Content) Wert (Botstein et al. 1980). Dieser ist umso höher, wenn man bei möglichst vielen Nachkommen vom Vorliegen eines bestimmten Markerallels auf das Vorliegen eines bestimmten QTL-Allels beim Elter schließen kann (Hildebrand et al. 1992).

## 2. Geeignetes Tiermodell

Für die genomweite Kartierung von QTL wird klassischerweise entweder ein F2- oder ein BC-Tiermodell genutzt. Die Modelle unterscheiden sich in ihrer Eignung, je nachdem ob mehr Wert auf die Entdeckung von Additiven oder Dominanz-Effekten gelegt wird (Falconer und Mackay 1996, S.367; Darvasi 1998). In dem interessierenden Merkmal stark divergierende Founderrassen sind zur Erstellung einer Kreuzungspopulation besonders geeignet (Lander und Botstein 1989; Miles und Wayne 2008), da hier auch von einer Segregation der QTL-Allele in der Nachkommenschaft ausgegangen werden kann. Dies wurde in einer F2-Studie an Tieren der Anpaarung Europ. Wildschwein x Edelschwein experimentell bestätigt (Andersson 1994). Durch Kreuzung von informativen F1-Tieren kann eine F2-Generation generiert werden, in der am beobachteten Markerlocus Homo- und Heterozygotie in verschiedenen Frequenzen auftritt. Hierbei wird von erhaltenen Daten über genetische Marker und der Ausprägung des beobachteten quantitativen Merkmals in der Folgegeneration auf die Segregation der QTL-Allele geschlossen (Andersson 2001).

#### 3. Standardisierte Erhebung phänotypischer Daten

Für eine betrachtete Population gilt: V(P) = V(G) + V(E) (Kearsey 1998). Um den Anteil der umweltbedingten Variation an der Gesamtvariation möglichst gering zu halten, muss die Versuchstierpopulation unter standardisierten Bedingungen gehalten werden.

#### 4. Durchführung/Auswertung mittels geeigneter statistischer Verfahren

Für die QTL-Kartierung wurden verschiedene Methoden entwickelt, die sich in ihrer Komplexität unterscheiden (Manly und Olson 1999), diese reichen vom einfachen Assoziationstest (ANOVA) über die 1989 von Lander und Botstein in die Literatur eingeführte einfache Intervallkartierung (SIM) bis hin zum Composite Interval Mapping (CIM) (Zeng 1994). Um die wahrscheinlichste Position für einen QTL schätzen zu können, existieren zwei alternative Rechenmodelle. Das Maximum-Likelihood Modell ermittelt den Quotient aus der Wahrscheinlichkeit, dass sich an einer bestimmten Stelle ein QTL befindet und der Wahrscheinlichkeit der Gegenhypothese (Lander und Botstein 1989). Dieses Wahrscheinlichkeitsverhältnis wird in regelmäßigen Abständen über das gesamte Chromosom geprüft und ergibt jeweils eine Likelihood Ratio (LR). Als Prüfgröße wird der LOD-Score angegeben (Murken et al. 2011, S.347). Eine Alternative dazu stellt das Least Square Regressionsmodell (Haley und Knott 1992) dar, dass die wahrscheinlichste Position eines QTL über die Methode der kleinsten Abweichungsquadrate ermittelt. Als Prüfgröße wird der F-Wert angegeben. Als Weiterentwicklung des SIM wurde 1994 von Zeng das Composite Interval Mapping vorgestellt. Dessen Vorteil ist, dass indem zusätzliche Marker als Covariablen in die Teststatistik integriert werden, ein QTL in einem betrachteten Intervall von weiteren, außerhalb liegenden, mit ihm verlinkten QTL "entkoppelt" wird. Damit wird ein Problem der SIM, dass multiple QTL nicht voneinander unterschieden werden können, gelöst (Zeng 1994). Laut Hayashi et al. (2002) ist das CIM auch geeignet zur Kartierung von QTL in ausgezüchteten Populationen, wie sie im Regelfall bei Nutztieren zur QTL-Analyse zur Verfügung stehen.

#### 2.3.2 Genetical Genomics und eQTL

Der Begriff "Genetical Genomics" wurde erstmals in einer Publikation von Jansen und Nap (2001) verwendet. Der propagierte Ansatz kombiniert Informationen aus der klassischen QTL-Analyse mit Ergebnissen von genomweiten Expressionsanalysen. Diese Vorgehensweise wird auch als eQTL-Analyse bezeichnet. eQTL sind Genomregionen, die die Expressionslevel von unterschiedlichen Genen steuern (Abb.1). Ein Beispiel dafür, dass auch Transkripte polygener Vererbung unterliegen, lieferten Brem und Kruglyak (2005) mithilfe einer QTL-Analyse an Sacharomyces cerevisiae, bei der die Transkription der untersuchten Gene in > 50 % der Fälle durch 5 oder mehr Loci beeinflusst wurde. In der eQTL-Analyse werden anstatt klassischer quantitativer Merkmale Gen-Expressionslevel als Phänotypen für die QTL-Analyse verwendet (de Koning et al. 2007; Sellner et al. 2007). Dies ist möglich, da Unterschiede in Transkriptmengen häufig signifikant mit klassischen Merkmalen in segregierenden Populationen korrelieren. Daher sind sie als Ersatz geeignet, wenn keine phänotypischen Daten verfügbar sind (Schadt et al. 2003). Wird der eQTL in der Genomregion kartiert, in der sich auch das differentiell exprimierte Gen befindet, wird ein Polymorphismus in der regulatorischen Region des Gens als wahrscheinlich betrachtet (Gibson und Weir 2005) und man bezeichnet den eQTL als "cis-acting" (Jansen und Nap 2001). "Trans-acting" dagegen liegt vor, wenn sich eQTL und reguliertes Gen nicht in unmittelbarer Nähe auf dem Genom befinden. Der Nutzen der eQTL-Analyse liegt in der Möglichkeit, 1) Kandidatengene für produktions-assoziierte Merkmale zu finden und 2) anhand erhaltener Informationen über Beziehungen zwischen Genen regulatorische Netzwerke zu konstruieren, die weiteren Aufschluss über die Entstehung von phänotypischen Varianten geben können (Sellner et al. 2007). Mehrere Studien sind zu dem Schluss gekommen, dass sog. Major QTL existieren, die die Transkriptmengen sehr vieler Gene beeinflussen. Diese "Strippenzieher"-Loci bezeichnet man auch als "Hotspots der Genregulation" (Schadt et al. 2003), sie können in Einzelfällen über tausend Transkripte regulieren (Chesler et al. 2005). Sun und Schliekelman (2011) beschreiben eine Methode, um vom Phänotyp "Transript-Expressionslevel" auf den Genotyp am putativen kausativen Locus schließen zu können. Um das Problem der QTL-Analyse, aus vielen möglichen Kandiatengenen, die "richtigen" zu identifizieren zu überwinden, schlagen de Koning et al. (2007) einen Ansatz vor, der eQTL-Analyse mit Feinkartierung von funktionellen Kandidatenloci kombiniert.


**Abb.1: Genetical Genomics-Prinzip**. Über das Genom verteilte, kausative Loci (eQTL) beeinflussen über ein Netzwerk aus untereinander verlinkten Genen einen klinischen Phänotyp (modifiziert nach Sun und Schliekelman 2011)

## 2.3.3 MAS und genomische Selektion

Mithilfe der sog. "Marker-Assisted Selection" (MAS) wird die Assoziation von Markern mit kartierten QTL überprüft, bei signifikantem Kopplungsungleichgewicht geht der Marker als Information in die Zuchtwertschätzung ein. Ein Hauptproblem für die Anwendung der MAS ist, dass in den meisten Fällen der durch einen signifikant assoziierten Marker aufklärbare Anteil der genetischen Variation die einem quantitativen Merkmal zugrundeliegt, gering ist (Goddard et al. 2010). Der Nutzen der MAS ist daher beschränkt auf monogenetische Merkmale oder Merkmale, die durch einige, wenige Gene beeinflusst werden (Hayes und Goddard 2010). Die Einsatzmöglichkeiten für eine Zuchtwertschätzung mittels MA-BLUP sind bis heute limitiert auf wenige Merkmale, die auf Variationen in Majorgenen beruhen

(Buske und Gengler 2009), z.B. das Ryanodinrezeptor- Gen oder IGF-2 (Dekkers 2004). Mit der Verfügbarkeit hoch auflösender genetischer Karten und dichter Genomabdeckung mit SNP-Markern, sowie der Möglichkeit, die dort vorliegenden Allele mithilfe von High-Throughput-Genotyping zu bestimmen, wurde die von Meuwissen et al. (2001) erstmals vorgestellte Idee einer Selektion nach rein genetischen Informationen umsetzbar. Demnach kann idealerweise bei einer ausreichend dichten Abdeckung des Genoms mit Markern alle genetische Variation für ein quantitatives Merkmal durch Variabilität in den Markergenotypen erklärt werden (Meuwissen et al. 2001). Das grundlegende Prinzip dieser genomischen Selektion ist, dass durch die hohe Markerdichte jeder QTL direkt oder indirekt mit mindestens einem SNP assoziiert ist und dadurch die genetisch bedingte phänotypische Variation komplett aufklärbar ist (Albers und Charagu 2010; Calus 2010). Im Gegensatz zur MAS werden bei der genomischen Selektion also alle informativen SNPs in der ZWS und damit auch der Einfluss von kleinen, unkartierten QTL berücksichtigt. Aufgrund dieses Prinzips ist die genomische Selektion besonders geeignet zur Vorhersage von quantitativen Merkmalen, die geschlechtsgebunden oder schwer zu messen sind (Hayes und Goddard 2010). Im Gegensatz zur konventionellen BLUP-ZWS, bei der für die Ermittlung von Zuchtwerten Eigen,- Verwandten,- oder Nachkommensleistungen betrachtet werden, steht bei der genomischen ZWS die Phänotypisierung und Genotypisierung einer Referenzpopulation am Anfang, aus diesen Daten werden mithilfe unterschiedlicher mathematischer Modelle Markereffekte auf ein quantitatives Merkmal geschätzt (Hayes et al. 2009). Die weitere Selektion von Zuchttieren beruht auf deren GEBV (Genomic Estimated Breeding Value), der die Summe aller Markereffekte wiederspiegelt (Thaller 2009). Am längsten angewendet wird die genomische Selektion bisher beim Rind. Evaluierungen dieser Methode an nordamerikanischen Holstein-Friesian zeigen, dass die Vorteile der genomischen über in konventioneller ZWS der signifikant erhöhten Vorhersagegenauigkeit, einer Beschleunigung des genetischen Fortschritts p.a. und stark verminderten Kosten für die Datenerhebung liegen (Schaeffer 2006; Van Raden et al. 2009). Birgt die genomische ZWS beim Rind das hauptsächliche Verbesserungspotential in einer Verkürzung des Generationenintervalls (Bennewitz 2009), wird sich die Hauptwirkung in der Schweinezucht durch erhöhte Selektionsintensität und Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit entfalten (Simianer 2009). Wie bereits oben erwähnt, soll die genomische Selektion daher vorwiegend im Bereich bisher wenig genau vorhersagbarer Merkmale Vorteile bringen (Ibanez-Escriche und Gonzalez-Recio 2011). Der jährliche genetische Fortschritt bei der Selektion auf weibliche Reproduktionsmerkmale kann durch genomische Selektion im Vergleich zu

konventioneller Selektion signifikant erhöht werden (Lillehammer et al. 2011). Auch bei zusätzlicher Einbeziehung von Produktionsmerkmalen übertreffen sämtliche Schemata der genomischen Selektion die Wirkung konventioneller Selektion, der genetische Fortschritt p.a. ist um mindestens 13% erhöhbar, wohingegen eine Verminderung der Inzuchtrate um mindestens 40% möglich ist (Lillehammer et al. 2013). Tribout et al. (2012) zeigen anhand einer simulierten, der Vaterrasse Pietrain nachempfundenen Population, dass die Vorhersagegenauigkeit der genomischen Selektionsszenarien denen der konventionellen überlegen ist und eine konsequente Anwendung den Inzuchtkoeffizienten weniger ansteigen lässt. Es ist zu erwähnen, dass die genomische Selektion beim Schwein noch in den Anfängen steht und genannte Studien mit mathematischen Simulationen von Populationen arbeiten. Praktisch eingesetzt wird die genomische Selektion seit 2010 bei Zuchttieren verschiedener Rassen in Dänemark (DanZucht 2011), in Deutschland sind genomisch unterstützte Zuchtwerte für Tiere der Rasse Pietrain verfügbar (Bennewitz und Bielfeldt 2012). Die errechneten Ergebnisse lassen erwarten, dass die flächendeckende Einführung der genomischen Selektion der Schweinezucht die Möglichkeit bietet, bei der effizienten, ökonomisch sinnvollen Auswahl von Zuchttieren einen großen Schritt weiter zu machen.

#### 2.4 Actinobacillus pleuropneumoniae

## 2.4.1 Ätiologie

Bei *Actinobacillus pleuropneumoniae* handelt es sich um Gram-negative, bekapselte kokkoide Stäbchen, die sich der Familie der *Pasteurellaceae* zuordnen lassen (Gottschalk 2012, S.653). Es existieren zwei Biotypen (NAD-abhängig und NAD-unabhängig; Pohl et al. 1983). Zurzeit sind 15 unterschiedliche Serotypen bekannt, die in Immunogenität und Virulenz differieren (Haesebrouck et al. 1997; Klitgaard et al. 2010). *Actinobacillus pleuropneumoniae* besitzt eine Reihe von Virulenzfaktoren, darunter LPS und eine serotypabhängige Konstellation der ApX-Toxine I-IV, die hämolytische und/oder zytotoxische Eigenschaften haben. Eine besondere Rolle spielen äußere Membranproteine (OMP), wie Hb-bindende Proteine (Archambault et al. 2003) und die Transferrin- bindenden Proteine TbP1 und 2 (Baltes et al. 2002; Jacques 2004), da sie die Versorgung des Mikroorganismus mit Eisen sicherstellen. Störungen des bakteriellen Eisenstoffwechsels wirken sich negativ auf Wachstum und Virulenz aus (Jacobsen et al. 2005).

#### 2.4.2 Klinik und Epidemiologie

*Actinobacillus pleuropneumoniae* verursacht eine hämorrhagisch-fibrinöse bis nekrotisierende Pleuropneumonie (Ewald et al. 1989), deren Verlauf von verschiedenen Faktoren wie z.B. Tierdichte, Immunitätsstatus des Bestandes und Management abhängig ist (Sebunya und Saunders 1983). Die Einschleppung erfolgt i.d.R. über latent infizierte Zukäufe, die weitere Verbreitung über Tröpfcheninfektion (Gottschalk 2012, S.656).

# 2.4.3 Relevanz

*Actinobacillus pleuropneumoniae* gehört zu den wichtigsten bakteriellen Erregern respiratorischer Infektionen beim Schwein und ist weltweit verbreitet (Gottschalk 2012, S.653). Je nach Region dominieren einzelne Serotypen das Infektionsgeschehen(Eine Übersicht findet sich bei Dubreuil et al. 2000). Der wirtschaftliche Schaden durch diese Infektionen ist beträchtlich. In einer Metaanalyse über die Höhe der Verluste, die den Schweineproduzenten durch *Actinobacillus pleuropneumoniae* entstehen, wurden deutliche Verminderungen der Tageszunahme (-33%) und Futterverwertung (-25,5%) sichtbar (Straw et al. 1989). Schoder et al. (1993) ermittelten Erkrankungen des Respirationstrakts, insbesondere fibrinöse Pleuropneumonie, als häufigste Abgangsursache in einem Schweinemastbetrieb. In einer neueren Erhebung wurde der jährliche Verlust für die US-Industrie durch *Actinobacillus pleuropneumoniae* auf 32 Mio. US\$ beziffert (Losinger 2005).

#### 2.4.4 Natürliche Resistenz gegenüber Actinobacillus pleuropneumoniae

Dass Resistenzunterschiede zwischen verschiedenen Rassen gegenüber einer *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Infektion existieren, wurde von einer Infektionsstudie mit Schweinen der Rassen DL, DE, Hampshire und Pietrain bestätigt. Beim Anlegen eines neu etablierten Bewertungsmaßstabs (RHS= Respiratory Health Score) zur Beurteilung der Schwere einer respiratorischen Infektion fiel auf, dass sich Tiere der Rassen Hampshire und DL bzw. Pietrain an entgegengesetzten Enden der Skala akkumulierten (Höltig et al. 2009).

#### 2.4.5 Forschungsstand

Verschiedene Studien beschäftigten sich mit der Identifikation von möglichen Biomarkern für eine Actinobacillus pleuropneumoniae-Infektion oder respiratorischen Infektionen im Allgemeinen. Das antimikrobielle Peptid PR-39 war signifikant erhöht bei einer chronischen Actinobacillus pleuropneumoniae-Infektion (Hennig-Pauka et al. 2006) aber auch bei respiratorischen Infektionen die durch eine Vielzahl anderer Erreger hervorgerufen wurden (Hennig-Pauka et al. 2007). Benga et al. (2009) bestimmte die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, anorganischen Verbindungen des Respiratory Burst und Zytokinen infolge einer experimentellen Actinobacillus pleuropneumoniae-Infektion bei vier verschiedenen Schweinerassen. Die je nach Rasse, Individuum und Messzeitpunkt variierenden Expressionslevel wiesen auf das Vorliegen unterschiedlicher Immunphänotypen hin (Benga et al. 2009). Eine Expressionsanalyse von Glykoproteinen aus BALF wurde im Zuge eines Actinobacillus pleuropneumoniae-Infektionsversuchs an Tieren dreier Rassen durchgeführt. Unter den 12 differentiell exprimierten Proteinen befand sich AHSG, dessen Expressionslevel u.a. signifikant negativ mit dem Vorhandensein von Lungenläsionen bei Hampshire-Schweinen korreliert war (Kahlisch et al. 2009). Eine verminderte Expression von AHSG in der Leber experimentell mit Actinobacillus pleuropneumoniae infizierter Schweine wurde auch von Hedegaard et al. (2007) gefunden. Eine Assoziation von Markergenotypen des Transferrin-Gens mit dem RHS, der die Schwere einer Infektion wiederspiegelt, ist ebenfalls bekannt. Heterozygotie am Markerlocus c.1899+29 C/T lag besonders häufig bei schwer erkrankten Tieren der Deutschen Landrasse vor (Danilowicz et al. 2009).

#### 2.5 Kandidatengene

Kandidatengene sind Gene, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ausprägung eines oder mehrerer betrachteter Merkmale beeinflussen (Geldermann 2005, S.294). Je nachdem, ob man die Einbindung des Gens in die interessierenden physiologischen oder pathologischen Prozesse, die Wirkung des Genprodukts oder die Lage des Gens im Genom betrachtet, unterscheidet man homolog-physiologische, funktionelle und positionelle Kandidatengene (Reiner 2008). Alle Gene, die sich im Bereich eines QTL befinden, sind als positionelle Kandidatengene (Mayne und McIntyre 2002).

## 2.5.1 AHSG

*Bezeichnung*: AHSG (α2-Heremans-Schmid Glycoprotein); Fetuin A (NCBI 2012a)

Lokalisation: SSC13(133813482-133839175) (NCBI 2012a)

*Länge*: 25694 bp (NCBI 2012a)

Porcines AHSG setzt sich aus 362 Aminosäuren zusammen (NCBI 2012b). Die codierende Sequenz umfasst 7 Exons (NCBI 2012a). Bisher sind 186 SNPs im gesamten Gen bekannt (NCBI 2012c).

## Aufbau, Vorkommen:

Fetuin-Protein wurde erstmals aus neonatalem Kälberserum isoliert und charakterisiert (Pedersen 1944). Es handelt sich um ein der Cystatin-Superfamilie zugehöriges, im Überschuss vorkommendes Serum-Glykoprotein, das sich in zwei Cystatin-like-Domänen und eine Carboxy-terminale Domäne gliedert (Brown et al. 1992). Die bereits bei Pedersen auffällig hohe Konzentration des Proteins im Neonaten wurde bestätigt, als Saunders et al. (1994) sowohl mRNA als auch Protein in vielen fötalen Geweben beim Schaf nachweisen konnten. Fetuin stellt bei Wiederkäuer-Föten bis zu 50 % des Gesamtproteins (Osawa et al. 1997). Beim adulten Tier und Menschen beschränkt sich seine Produktion auf Leber und Knochenmark (Srinivas et al. 1993; Dziegielewska et al. 1996).

#### Funktion, Bedeutung bei der Entstehung von Krankheiten:

AHSG greift in die Insulin-Rezeptor-Signalkaskade ein, indem es die durch Substratbindung induzierte Autophosphorylierung und Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors hemmt (Srinivas et al. 1993; Mathews et al. 2002; Stefan et al. 2006). Da AHSG die Insulin-Wirkung am Rezeptor antagonisiert, wurde es im Zusammenhang mit Insulin-Resistenz-assoziierten Erkrankungen erforscht. AHSG-Knockout Mäuse blieben trotz fetthaltiger Fütterung insulin-sensitiv und resistent gegenüber Adipositas (Mathews et al. 2002). Auch altersbedingter Verlust der Insulin-Sensitivität war bei Knockout-Mäusen signifikant geringer als bei gleichaltrigen Wildtypen (Mathews et al. 2006). Beim Menschen waren hohe AHSG-

Serumlevel negativ mit Insulin-Sensitivität und positiv mit Glucoseintoleranz korreliert (Stefan et al. 2006). In einer genomweiten Assoziationsstudie an von Diabetes Typ II betroffenen Familien wurde ein mit Empfänglichkeit assoziierter Locus auf Chr. 3q 27 kartiert, wo sich beim Menschen das AHSG-Gen befindet (Vionnet et al. 2000). In derselben Region wurde ein signifikant mit Phänotypen des Metabolischen Syndroms assoziierter QTL von Kissebah et al. (2000) kartiert. Die multiplen Eigenschaften des negativen Akute-Phase-Proteins AHSG werden bei Betrachtung seiner Rollen in der Immunabwehr und Modulation entzündlicher Prozesse deutlich. Als aspezifisches Opsonin kann AHSG die Phagozytose bakterieller Pathogene verstärken und markiert abzubauende neutrophile Granulozyten (van Oss et al. 1974; Hart et al. 2003). Desweiteren moduliert AHSG die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL6, IL1 und TNFa (Hennige et al. 2008). Durch seine inhibitorische Wirkung auf die Ablagerung von Ca-Ph-Verbindungen stellt AHSG ein Bindeglied zwischen chronisch-entzündlichen Prozessen und durch Kalzifizierung charakterisierte Pathologien dar. AHSG (-/-) Mäuse zeigten beispielsweise starke Mineralablagerungen in glatten Muskelzellen arterieller Wände (Reynolds et al. 2005). Beim Menschen ist eine signifikante, negative Korrelation zwischen AHSG-Konzentration und Versteifung von Arterien durch mineralische Einlagerungen bekannt (Pateinakis et al. 2013). AHSG trägt also nicht unerheblich zur Pathogenese von Krankheiten wie Atherosklerose oder Rheumatoider Arthitis bei. Zusätzlich zu seiner Fähigkeit, den Metabolismus und inflammatorische Prozesse zu beeinflussen, greift AHSG in die Tumorigenese TGFBinduzierter Tumoren ein und ist für andere Krebsarten als Marker nutzbar (Swallow et al. 2004; Dowling et al. 2007; 2012). In einer Analyse des Glykoprotein-Expressionsprofils von experimentell mit Actinobacillus pleuropneumoniae infizierten Schweinen unterschiedlicher Rassen zeigte sich, dass AHSG differentiell exprimiert wurde und hohe Level mit Nicht-Vorhandensein von Lungenläsionen bei Hampshire-Schweinen korreliert waren (Kahlisch et al. 2009). Die Autoren stuften AHSG daher als geeigneten Biomarker für eine chronische Infektion ein.

Diese heterogene Komposition an Eigenschaften lässt vermuten, dass noch nicht alle Funktionen von AHSG bekannt und hinreichend erforscht sind und fordert eine weitere Untersuchung des Gens auch unter dem Aspekt seiner Wirkung auf Krankheitsresistenz.

## 2.5.2 IL12A

*Bezeichnung*: Interleukin 12, Untereinheit A bzw. p35; NKSF (Natural Killer Cell Stimulatory Factor 1); CLMF (Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor 1) (NCBI 2012d)

Lokalisation: SSC13 (108066792-108074477) (NCBI 2012d)

*Länge*: 7686 bp (NCBI 2012d)

Im gesamten porzinen IL12A Gen sind bis dato 47 SNPs bekannt (NCBI 2012f). Das Protein wird durch 7 Exons codiert und hat eine Länge von 256 Aminosäuren (NCBI 2012d, e).

### Aufbau:

Für ein funktionsfähiges, biologisch aktives Genprodukt müssen p35 und p40 Untereinheit (UE) heterodimerisieren (Cesano et al. 1993; Foss und Murtaugh 1997). Die beiden UE sind unterschiedlich strukturiert, während p35 zur  $\alpha$ -Helix-reichen Zytokinfamilie zählt, lässt sich p40 der Hämatopoetin-Rezeptor-Familie zuordnen (Gately et al. 1998). Anstelle der früher verwendeten Bezeichnungen NKSF (Kobayashi et al. 1989) und CLMF (Gubler et al. 1991) hat sich der Proteinname IL12A durchgesetzt.

#### Funktion:

Das proinflammatorische Zytokin IL12A belegt eine Mittlerposition zwischen angeborener und erworbener Immunität (Tripp et al. 1994), das viele seiner Wirkungen via IFNy transmittiert. IL12 ist einer der Hauptakteure im Immunsystem, der die Balance innerhalb der adaptiven Immunantwort zugunsten einer vorwiegend TH1-dominierten Abwehr verschiebt (Trinchieri 1995). Eine Reihe weiterer bekannter IL12-Effekte zeigen, dass dieses Zytokin zentral an der körpereigenen Abwehr beteiligt ist. IL12 wird als Reaktion auf bakterielle Bestandteile von B-Lymphozyten (Podlaski et al. 1992), Makrophagen, Monozyten, (Hsieh et al. 1993; Foss und Murtaugh 1997), Neutrophilen und Antigen-präsentierenden Zellen (Cho et al. 2005) produziert. Eine seiner Hauptaufgaben ist die Initiierung der "first line of defense" via Steigerung der IFN $\gamma$ -Sekretion in NK- und T-Zellen, sowie die Erhöhung der Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen (Kobayashi et al. 1989) in Abhängigkeit von TNF $\alpha$  (Wu et al. 1993). Auch die Proliferation und Maturation von CD4- und CD8- positiven Zellen wird durch IL12 gefördert, wobei die CD4-Zellen auf das einwirkende Zytokinspektrum mit Reifung zu bewaffneten T-Zellen reagieren und dadurch eine vorwiegend zellvermittelte Abwehr etabliert wird (Janeway et al. 2002, S.422). IL2 dient in vielen Fällen als Costimulator, der additiv oder synergistisch wirken kann (Cesano et al. 1993; Pintaric et al. 2008).

#### Bedeutung bei der Entstehung von Pneumonien:

In einer Infektionsstudie an experimentell mit Actinobacillus pleuropneumoniae infizierten Schweinen wurde ein mRNA-Expressionsprofil für die Zytokine IL10, IL12 p35 und IL12 p40 erstellt. Die starke Kolokalisation der Hybridisierungssignale mit entzündungsbedingten Lungenveränderungen deutete auf eine Beteiligung dieser Zytokine bei der Entstehung der Actinobacillus pleuropneumoniae-typischen Pathologie hin (Cho et al. 2005). Eine ähnliche Studie von Baarsch et al. (1995) zeigte, dass auch weitere proinflammatorische Zytokine wie TNFα, IL1 und IL8 während der akuten Phase einer Infektion in der Lunge vorhanden sind und zur Pathogenese beitragen. Durch Applikation des antiinflammatorischen Zytokins IL10 vor einer Infektion wurde die Produktion dieser entzündungsfördernden Zytokine und infolge dessen das Auftreten entzündlicher Lungenveränderungen in hohem Maße verringert (Morrison et al. 2000). Bei einer experimentellen Infektion mit Mycoplasma hyopneumoniae wurde die starke Assoziation zwischen dem konzentrierten Auftreten von IL12 und IFNy in entzündlich veränderten Lungenregionen ebenfalls festgestellt, was wiederum für eine Beteiligung an der lokalen Abwehr gegenüber dem Bakterium spricht (Rodriguez et al. 2007). In einer ähnlich konzipierten Studie wurde ein solcher Zusammenhang auch für IL12, IL10 und PRRSV gezeigt (Chung und Chae 2003). Carter und Curiel (2005) wiesen die Effektivität der Applikation von rekombinantem IL12 bei der Bekämpfung von PRRSV in vivo und in vitro nach. Die Interaktionen der Zytokine untereinander und mit dem Pathogen sind hochkomplex und noch nicht vollständig verstanden (Dwivedi et al. 2012). Da IL12 nicht nur für verschiedene respiratorische Erkrankungen sondern auch für die Immunabwehr im Allgemeinen von Bedeutung ist, muss eine weitere Erforschung des Gens und seines Proteinprodukts im Sinne der Aufdeckung grundlegender Abwehrmechanismen erfolgen. Eine von Wimmers et al. (2008) durchgeführte Assoziationsstudie von IL12-SNPs mit einer großen Anzahl immunologischer Merkmale spricht ebenfalls dafür, dass IL12 A und IL12B als Kandidatengene für Immunkompetenz anzusehen sind.

Bedeutung bei der Entstehung /Therapie weiterer Krankheiten:

Ob IL12 günstig oder ungünstig auf die Pathogenese von Krankheiten einwirkt, hängt davon ab ob eher eine TH1- oder eine TH2-dominierte Antwort adäquat zur Bekämpfung des Pathogens ist. Die Behandlung mit rekombinantem IL12 vermittelte bei einer *Leishmania major*-Infektion empfänglicher Mäuse beispielsweise einen protektiven Effekt, indem die günstige TH1-Antwort bevorzugt wurde (Heinzel et al. 1993). Der gleiche Sachverhalt konnte bei muriner Listeriose festgestellt werden, eine nachfolgende Applikation von Anti-IL12-Ak führt zum Erlöschen der Schutzwirkung (Tripp et al. 1994). Destruktive Wirkung entfaltet IL12 bei verschiedenen chronischen Prozessen wie z.B. Colitis durch anhaltende IFNɣ-Produktion. Anti-IL12-Ak führten hier zu einer deutlichen Verbesserung des klinischen und histologischen Bilds (Neurath et al. 1995). IL12 (-/-) Mäuse zeigten bei einer Kollageninduzierten Arthritis eine signifikante Verminderung klinischer Symptome (Mc Intyre et al. 1996; Gately et al. 1998).

# 2.5.3 MYD88

Bezeichnung: Myeloid-Differentiation-Primary-Response-Gene 88 (MYD88) (NCBI 2012g)

Lokalisation: SSC13 (25181100-25183718) (NCBI 2012g)

*Länge*: 2619 bp (NCBI 2012g)

Im porzinen MYD88 Gen sind bis dato 19 SNPs bekannt (NCBI 2012i). Das Gen beinhaltet 5 Exons. Das Genprodukt besteht aus 293 Aminosäuren (NCBI 2012g, h).

# Aufbau:

MYD88 besitzt zwei funktionelle Untereinheiten. Die N-terminale Death-Domäne und die Cterminale TIR (Toll-IL1-Rezeptor)-Domäne sind über eine Interdomäne verbunden und vermitteln die Bindung an die entsprechenden Domänen von IRAK (IL1-Receptor-associated-Kinase) 4 bzw. TLR (Tohno et al. 2007; Kawai und Akira 2007).

### Funktion:

MYD88 spielt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort als Adapterprotein im TLR-Pathway. Toll-like-Rezeptoren sind hochkonservierte Mitglieder der TIR (Toll-IL1-Rezeptor)-Superfamilie, zu der auch IL1-Rezeptoren zählen. (Liew et al. 2005). Beide sind wichtig für das Auslösen sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort in Folge der Stimulation mit Pathogen-Spezifischen Strukturen (PAMPs) (Janeway und Medzhitov 2002). Als Bestandteil der "first line of defense" gegenüber Pathogenen haben sie eine Schlüsselfunktion in der Immunabwehr inne (Akira et al. 2006; Kawai und Akira 2007). Allen TLR ist gemeinsam, dass am Ende der Signalkaskade der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert wird, der die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die Induktion antimikrobieller Gene reguliert (Kawai und Akira, 2007). Die adaptive Immunantwort wird durch Maturation dendritischer Zellen und infolge dessen gesteigerte Antigen-Präsentation vorangetrieben (Janeway und Medzhitov 2002).

### TLR- Kaskade:

Die von Toll-like-Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen erkannten PAMPS sind ausschließlich (LPS) oder vorwiegend (unmethyliertes CpG) bei einer Invasion von Pathogenen im Körper vorhanden. Jeder der TLR kann durch verschiedene Liganden aktiviert werden; beispielsweise TLR2 durch LPS (Werts et al. 2001), Glycolipide und äußere Membranproteine (Aderem und Ulevitch 2000), TLR4 durch LPS, Flavolipin und Hüllenproteine (Takeuchi et al. 2000; Akira et al. 2001), TLR5 durch Flagellin (Havashi et al. 2001), TLR7 durch Imidazoquinoline (Hemmi et al. 2002) und TLR9 durch unmethylierte CpG DNA (Akira et al. 2001). Eine vollständige Übersicht findet sich bei Janeway und Medzhitov (2002). Dieses Ansprechen auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Liganden ermöglicht es dem Organismus, auf eine große Bandbreite potentieller Pathogene reagieren zu können. Durch die Aktivierung von TLR, IL1 R oder IL18R wird das intrazytoplasmatische Adaptermolekül MYD88 aktiviert, welches via Interaktion mit IRAK4 die Phosphorylierung von IRAK1 fördert. Nach der Abspaltung des IRAK4-IRAK1-Komplexes erfolgt die Aktivierung des Adaptermoleküls TRAF6 (Kawai und Akira 2007). Durch TRAF6 werden sowohl MAP-Kinasen als auch NFkB aktiviert (Akira und Hoshino 2003). Durch Phosphorylierung der inhibitorischen IkB Proteine wird schließlich der Transkriptionsfaktor NFκB freigesetzt (Wesche et al. 1997). Dies führt zu vermehrter Produktion proinflammatorischer Zytokine und durch Reifung dendritischer Zellen zu erhöhter Antigenpräsentation (Akira et al. 2000; Kaisho und Akira 2001; Janeway und Medzhitov 2002). Der Endpunkt der TLR-Signalkaskade bildet damit auch eine Schnittstelle zur Induktion der adaptiven Immunantwort. Neben dem beschriebenen MYD88-abhängigen existiert ein MYD88-unabhängiger Signalweg, bei dem die Signalweitergabe durch den TLR mithilfe des Adapterproteins TRIF erfolgt. Diese Art der Signaltransduktion wird durch TLR3 (ausschließlich) und TLR4 (teilweise) genutzt (Akira et al. 2000).

#### Rolle von MYD88 bei der Entstehung von Krankheiten:

Eine funktionierende Signalweiterleitung via TLR und MYD88 ist für die Kontrolle und Bekämpfung von Infektionserkrankungen essentiell. Trotzdem ist diese Signalkaskade auf verschiedenen Ebenen Angriffspunkt inhibitorischer Mechanismen, die ihre Überstimulation und dadurch geförderte destruktive Wirkung hemmen. Anhand von Studien an MYD88 (-/-) Mäusen und IRAK4 (-/-) Mäusen konnte die zentrale Rolle der TLR-induzierten Abwehr durch erhöhte Anfälligkeit der Tiere gegenüber einer Vielzahl bakteriellen, viralen und parasitären Erregern gezeigt werden. Eine hohe Mortalitätsrate im Säuglings- und Kleinkindalter bei MYD88- oder IRAK-defizienten Menschen zeigt, dass diese Gene in bestimmten Altersklassen als Semiletalfaktoren wirken (von Bernuth et al. 2012). Studien von Scanga et al. (2002) und Chen et al. (2002) bewiesen, dass die Wirtsresistenz gegenüber Toxoplasma gondii bei MYD88 (-/-) Mäusen stark herabgesetzt war, was sich u.a. in erhöhten Mortalitätsraten und Parasitenbürden äußerte. Der starke Einfluss der MYD88-abhängig und unabhängig induzierten Abwehrprozesse auf das Überleben einer Klebsiella-Pneumonie wurde durch Studien an MYD88 (-/-) und TRIF (-/-) Mäusen von Cai et al. (2009) und van Lieshout et al. (2012) deutlich. Sowohl Überlebenszeit als auch Pathogen-Clearance waren bei K.o. Mäusen gegenüber dem Wildtyp stark vermindert. Eine übermäßige und dauerhafte Aktivierung des TLR-Signalwegs ist allerdings auch unvorteilhaft, da die ständige Entzündungsförderung zu chronischen Organveränderungen und Emphysem führen kann. In diesem Fall verhindert ein Knockout der Gene des IL1-Rezeptors oder von MYD88 die Zytokinfreisetzung mit nachfolgender Destruktion des Lungenparenchyms (Couillin et al. 2009). Beim Säugetier existieren daher Hemmmechanismen, um die TLR/IL1-R Signaltransduktion zu verhindern. Beispielsweise existiert neben dem vollständigen MYD88 eine kürzere (s= short form) Variante, deren Aufgabe die Heterodimerisierung mit MYD88 und damit Verhinderung der Phosphorylierung von IRAK1 ist (Liew et al. 2005). Da das Verhältnis zwischen der Einleitung einer lebensnotwendigen Abwehrreaktion und der

Zerstörung eigenen Gewebes sensibler Einstellung bedarf, erfolgt die Produktion von MYD88s sehr begrenzt, nämlich ausschließlich in Milz und Gehirn (Janssens et al. 2002).

### 2.5.4 RUNX1

*Bezeichnung*: RUNX1 (Runt related transcription factor); AML1 (Akute Myeloische Leukämie-Gen 1); PEBP2αB (Phosphatidylethanolamine Binding Proteine 2αB); CBFα (Core Binding Factor α) (NCBI 2012j)

Lokalisation: SSC13 (208205560-208300127) (NCBI 2012j)

*Länge*: 94568 bp (NCBI 2012j)

Das porcine RUNX1-Gen beinhaltet 6 Exons, das Proteinprodukt besteht aus 480 Aminosäuren (NCBI 2012j, k). Bisher sind in der gesamten Gensequenz (nicht-kodierende und kodierende Bereiche) 1246 SNPs bekannt (NCBI 2012l).

## Aufbau:

RUNX1 stellt einen Teil des heterodimeren Transkriptionsfaktors CBF (Core-Binding Factor) dar (Zhang et al. 2003). Eine Kopplung mit dem Partnerprotein CBF $\beta$  ist notwendig, um die per se schwache DNA-Bindungsaffinität von RUNX1 um das 10 fache zu steigern (Okuda et al. 2001; Matheny et al. 2007) und den Abbau durch Proteinasen zu verhindern. Die Heterodimerisation erfolgt mittels der hochkonservierten Runt-Domäne, Namensgeber und DNA-bindenden Untereinheit von RUNX1 (Zhang et al. 2003). Diese besteht aus 128 Aminosäuren und entspricht in ihrer Faltung einem s-Typ Immunglobulin. Sie lässt sich strukturell und funktionell Transkriptionsfaktoren bzw. Protoonkogenen wie NF $\kappa$ B, NFAT, p53 und STAT-1 zuordnen (Berardi et al. 1999).

#### Funktion:

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 kann sowohl Aktivator,- als auch Repressorwirkung entfalten. Die letztendliche Wirkweise wird durch ein komplexes Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren oder -Repressoren (Mikhail et al. 2006;

Wong et al. 2011). Eine Übersicht der mit RUNX1 interagierenden Proteine findet sich bei Perry et al. (2002). RUNX1 spielt eine zentrale Rolle als Regulator hämatopoetischer Gene (Kurokawa und Hirai 2003). Dies zeigte sich in defizitärer Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen aller Linien mit nachfolgenden 100 % Letalität bei RUNX1 (-/-) Mäuseembryonen (Okuda et al. 1996). Da dosisabhängig, ist mindestens ein funktionelles RUNX1-Allel für die definitive Hämatopoese Voraussetzung (Okuda et al. 2001; Asou 2003). Weiterhin reguliert RUNX1 die Reifung und Differenzierung von CD4-und CD8-positiven T-Zellen (Hayashi et al. 2000) und ist für die Entfaltung der immunsuppressiven Wirkung regulatorischer T-Zellen notwendig (Wong et al. 2011).

#### Rolle von RUNX1 bei der Entstehung von Krankheiten:

AML1 alias RUNX1 wurde im Zuge der Erforschung der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) identifiziert, als das Gen, welches sich am Bruchpunkt der bei AML häufigen chromosomalen Translokation t(8/21) (q22/q22) befindet (Miyoshi et al. 1991). Insgesamt sind 22 Leukämieformen mit RUNX1-Beteiligung bekannt (Asou 2003). Die Runt-Domäne wird im Zuge der Translokation mit anderen Protein-kodierenden Genen gekoppelt, bei deren Translation entstehen chimäre Proteine (Lo Coco et al. 1997). Diese nicht-funktionellen Fusionsproteine tragen zur Leukämogenese bei, da die hämatopoetische Differenzierung nicht mehr oder nicht in vollem Ausmaß stattfindet. Zur Entstehung einer akuten Leukämie müssen allerdings weitere Mutationen dieses Geschehen potenzieren (Asou 2003). Auch seltener vorkommende Punktmutationen im RUNX1-Gen selbst besitzen hohe Leukämogenität. Diallele Mutationen werden vorwiegend bei Patienten mit MO-AML oder AML plus erworbener Trisomie 21 gefunden (Preudhomme et al. 2000). Monoallele Punktmutationen, deren Wirkung sich via Haploinsuffizienz oder negativer Dominanz entfaltet liegen dem Krankheitsbild FPD (Family Platelet Disorder) zugrunde und sind prädisponierend für AML, per se jedoch für die Ausprägung eines Leukämie Vollbilds ebenfalls nicht ausreichend (Osato 2004; Matheny et al. 2007). Die meisten Mutationen in RUNX1 betreffen die Runt- Domäne und vermindern die DNA- Bindungsfähigkeit um das 10-46000fache (Kurokawa und Hirai 2003; Matheny et al. 2007). Da bestimmte RUNX1-Mutationen mit Phänotypen wie Chemotherapeutika-Resistenz oder verminderter Überlebensrate assoziiert sind, dienen sie als Marker z.B. beim Myelodysplatischen Syndrom oder bei AML (Chen et al. 2007; Gaidzik et al. 2011).

Auch bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen spielt RUNX1 eine zentrale Rolle, darunter Rheumatoide Arthritis (Tokuhiro et al. 2003), Psoriasis (Yamada und Ymamoto 2005), und Systemischer *Lupus Erythematodes* (Shen und Tsao 2004). Hierbei existieren entweder Mutationen in den RUNX1 Bindungsstellen anderer Proteine (RA, Psoriasis, SLE) und /oder Mutationen im RUNX1 Gen selbst (RA).

#### 2.5.5 Transferrin

Bezeichnung: (Sero-) Transferrin, früher: Siderophilin, Kürzel: TF (NCBI 2012m)

Lokalisation: SSC 13, (82429011-82469009) (NCBI 2012m)

*Länge*: 39999bp (NCBI 2012m)

Im porzinen Transferrin-Gen sind bis dato 481 SNPs bekannt (NCBI 2012o). Es existieren mehrere Transkriptvarianten und Protein-Isoformen, das häufigste Genprodukt wird durch 17 Exons codiert und besteht aus 715 Aminosäuren (NCBI 2012m, n).

Funktion:

Die Hauptaufgabe von Transferrin besteht in dem extrazellulären Transport von Eisen in Form von Fe<sup>3+</sup> Ionen. Das Plasmaprotein besitzt regulatorische und protektive Funktionen, da nicht nur die Menge an freiem Eisen im Blut kontrolliert, sondern auch ein potentiell toxisches reaktives Agens gebunden wird (Li und Qian 2002). Das für zahlreiche Stoffwechselvorgänge notwendige Spurenelement Eisen wird der Zelle durch rezeptorvermittelte Endocytose von mit Fe<sup>3+</sup> beladenem TF via Transferrin-Rezeptor verfügbar gemacht (Qian et al. 2002). Transferrin besetzt somit nicht nur eine zentrale Position im Eisenstoffwechsel des Körpers, sondern beispielsweise auch in der Substratbereitstellung für Hämoglobin,- Myoglobin,- und Enzymsynthese (Lieu et al. 2001). In der Humanmedizin wird TF daher als nicht-viraler Transporter genutzt, um antitumorale Wirkstoffe gezielt in Krebszellen zu transportieren (Kratz et al. 1994; Li und Qian 2002). Da die Eisenakquisition für viele Mikroorganismen überlebenswichtig ist, besitzt Transferrin entscheidende Bedeutung bei der Pathogenese von Infektionskrankheiten, darunter der porcinen Pleuropneumonie. Studien von Ardehali et al.

(2003) und Bond et al. (2005) weisen darauf hin, dass Transferrin nicht nur Eisen vorenthalten, sondern auch bakterielle Adhäsion an Biomembranen hemmen kann und antifungale Eigenschaften besitzt. Diese Bandbreite an nutzbaren Eigenschaften zeigt, dass Transferrin ein entscheidender Bestandteil der angeborenen Abwehr ist und daher in die Erforschung der genetischen Krankheitsresistenz mit einbezogen werden sollte.

### Der Transferrin Zyklus:

Nach der Resorption über das Duodenum wird Eisen als Fe3+ an Transferrin gebunden (Ratledge 2007) und über den Blutkreislauf zu den Zielzellen transportiert. Der Großteil der Eisenutilisation erfolgt im Knochenmark im Zuge der Hämoglobinsynthese (Johnson und Wessling-Resnick 2011). Überschüssiges Eisen wird in Form von Ferritin in der Leber gespeichert. Für die Aufnahme von Eisen in die Zelle wird Ferrotransferrin an den membranständigen Transferrin-Rezeptor gebunden. Diese Interaktion wird durch HFE vermittelt und ist pH abhängig. Nach rezeptorvermittelter Endozytose über Clathrin coated pits wird Eisen durch Absenkung des endosomalen pH freigesetzt und ins Zytosol transportiert. Der übrige Komplex aus Apo-Transferrin und Transferrin-Rezeptor wird an die Zelloberfläche zurückgeschleust und dort recycelt (nach Li und Qian 2002).

## Die Rolle von Transferrin bei bakteriellen Infektionen und Transferrin-bindende Proteine:

Da Eisen essentiell für alle lebenden Zellen und die meisten Mikroorganismen ist (Ratledge 2007), befinden sich der infizierte Wirt und das Pathogen in ständiger Nährstoff-Konkurrenz. Ziel des Wirtsorganismus ist es, die eigene Eisenversorgung sicherzustellen und gleichzeitig dem Pathogen das Eisen vorzuenthalten, um dessen Wachstum zu hemmen. Dies erfolgt zum Beispiel durch Hypoferrämie infolge vermehrter Überführung des Eisens in die intrazelluläre Speicherform (Ferritin) oder verminderte duodenale Resorption (Weinberg 1978). Bakterien eigene Akquisitionsstrategien entwickelt. Dazu zählen haben dagegen direkte Eisenfreisetzung durch Hämolyse (z.B. EHEC, Vibrio, Mannheimia) und die Sekretion von Siderophoren, stark eisenaffinen, Chelatbildnern (Nau Cornelissen und Sparling 1994; Ratledge 2007). Die Gattungen Neisseria, Haemophilus, Actinobacillus, Mannheimia und Pasteurella dagegen verfügen über Membranproteine, die direkt mit Transferrin interagieren und diesem das Eisen entreißen (Ratledge 2007). Deneer und Potter (1989) erkannten einen Zusammenhang zwischen der Serum-Eisenkonzentration und der Synthese von zwei Häminbindenden Membranproteinen von Actinobacillus pleuropneumoniae. Gonzalez et al. (1990) beschrieben die Existenz von zwei ausschließlich porcines Transferrin bindenden

Oberflächenproteinen bei *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Konsens ist, dass unter Eisenentzug zwei circa 60 bzw. 110 kDa schwere Transferrin- bindende Proteine gebildet werden (TbPA und TbPB). Drei sequentiell und antigenetisch stark divergierende Isoformen von TbPA wurden von Gerlach et al. (1992) bei den *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Serotypen 1, 5 und 7 gefunden. Obwohl einige Isolate in der Lage sind, Hämoglobin als einzige Eisenquelle zu nutzen (Belanger et al.1995), sind Transferrin-bindende Proteine ansonsten obligat für die nutritive Versorgung des Bakteriums und Voraussetzung für dessen Virulenz (Baltes et al. 2002).

## Einfluss von Transferrin auf quantitative Merkmale, insbesondere Krankheitsresistenz:

Die Assoziation von verschiedenen Transferrin-Genotypen mit Resistenz/Empfänglichkeit wurde in mehreren Spezies für sehr unterschiedliche Krankheiten untersucht. Im Folgenden sollen nur einige Beispiele genannt werden. Verschiedene Transferrin-Allele beeinflussen signifikant mit subklinischer Mastitis assoziierte Merkmale beim Milchschaf (Steppa et al. 2009). Von Ju et al. (2011) wurden im bovinen Transferrin-Gen drei neue SNPs identifiziert, bei denen verschiedene Haplotyp-Kombinationen Produktionsmerkmale (Proteingehalt, 305d Milchmenge), aber auch ein Mastitis-assoziiertes Merkmal (SCS) beeinflussten. Von Salmoniden ist bekannt, dass die Anfälligkeit gegenüber Corynebakterien bei einigen Lachs-Zuchtlinien mit bestimmten Transferrin-Genotypen assoziiert ist (Winter et al. 1980).

### 2.5.6 Transferrin Rezeptor

Bezeichnung: Transferrin- Rezeptor; Kürzel: TFRC, TRFR, p90, CD71 (NCBI 2012p)

Lokalisation: SSC13, (143414634-143435426) (NCBI 2012p)

*Länge*: 20793 bp (NCBI 2012p)

Im porcinen Transferrin-Rezeptor-Gen sind bisher 144 SNPs bekannt (NCBI 2012r). Das Protein wird durch 18 Exons kodiert und besteht aus 768 Aminosäuren (NCBI 2012p, q).

### Aufbau:

Der Transferrin-Rezeptor (TFR) ist ein ubiquitär vorkommendes Transmembranprotein (Subramaniam et al. 2002). Es ist 3-teilig aufgebaut, mit einer extrazellulären Bindungsstelle für Transferrin und HFE sowie einer intramembranären und einer zytoplasmatischen Region (Aisen 2004). Hauptort der TFR-Synthese ist die Leber (Bomford und Munro 1985). Die TFR-Synthese wird durch die intrazelluläre Eisenkonzentration via IRES in der 3`UTR der mRNA reguliert (Rao et al. 1986; Müllner et al. 1989; Daniels et al. 2006).

Funktion: Ein funktionelles TFRC-Gen ist zwingend notwendig für Erythropoese und ZNS-Entwicklung (Levy et al. 1999). TFR kommt als Bindungspartner von diferrischem Transferrin eine Schlüsselrolle im Eisenstoffwechsel zu (TF-TFR-Zyklus: s.o.).

## Rolle von TFRC bei der Entstehung und Therapie von Krankheiten:

TFR1 spielt eine indirekte Rolle bei der Hereditären Hämochromatose (HH) des Menschen. Das nicht-klassische MHCI-Protein HFE senkt im funktionellen Zustand die Affinität von eisentragendem Transferrin zu TFR (Feder et al. 1996). Bei > 80% der HH- Patienten existiert eine missense-Mutation im HFE-Gen (Gross et al. 1998), dies resultiert in abnorm hoher Eisenaufnahme im Darm (Niederau 2009). Neben dieser häufigsten Form der HH gibt es drei weitere Hämochromatose-Formen, die auf Mutationen an unterschiedlichen Loci beruhen. Kawabata et al. (1999) konnten die Existenz eines zweiten Transferrin-Rezeptors (TFR2) nachweisen, welcher deutliche Unterschiede zu TFR1 aufweist. Beispielsweise ist die Affinität von TFR2 zu Holo-Transferrin 25x geringer als bei TFR1 (West et al. 2000) und ihre TF-Bindungsstellen nur zu 66% identisch (Girelli et al. 2002). Weder bindet TFR2 HFE (West et al. 2000), noch besitzt es Eisen-responsive Elemente in den UTR (Subramaniam et al. 2002). Mehrere Fallberichte deuten auf eine kausale Wirkung einer Exon-Mutation im TFR2-Gen bei der Entstehung der v.a. in Italien vorkommenden Hämochromatose III hin (Camaschella et al. 2002; Girelli et al. 2002; Lee und Barton 2006).

In einer Studie an humanen Diabetes Typ II-Patienten wurde ein signifikant höheres Erkrankungsrisiko bei bestimmten Genotypen eines TFRC-Polymorphismus festgestellt (Fernandez-Real et al. 2010). Bei Brustkrebspatienten wurde TFRC als geeigneter prognostischer Biomarker für Schwere der Erkrankung und Hormon-Resistenz identifiziert (Habashy et al. 2010).

Da TFRC in proliferierenden Tumorzellen in viel höherem Ausmaß exprimiert wird, stellt es ein geeignetes Antigen für eine gezielte Therapie vieler Krebsarten dar (Daniels et al. 2006). Sowohl monoklonale Antikörper, als auch an Transferrin gekoppelte Toxinkonjugate (Weaver und Laske 2003) können als Liganden im Zuge einer spezifischen Therapie eingesetzt werden.

## TFRC und genetische Krankheitsresistenz beim Schwein:

Das Gen für den intestinalen Rezeptor für F4ab/ac tragende *E. coli* wurde wiederholt in der Region um SSC13q41 kartiert (Python et al. 2002; Jørgensen et al. 2003; Niu et al. 2011). Folgestudien, die das positionelle Kandidatengen TFRC hinsichtlich seiner Assoziation mit Resistenz/Empfänglichkeit für Colidiarrhö weiter untersuchten, fanden keinen kausativen Polymorphismus (Python et al. 2005; Wang et al. 2007), jedoch SNPs die in starkem Kopplungsungleichgewicht zum merkmalsbeeinflussenden Locus standen (Wang et al. 2007; Jacobsen et al. 2010).

## **<u>3. Material und Methoden</u>**

### 3.1 Versuchstiere

Auf Basis einer Studie von Hoeltig et al. (2009) wurden die Rassen Hampshire und Deutsche Landrasse als Founderrassen ausgewählt, da sich diese als besonders divergierend hinsichtlich der Krankheitsresistenz gegenüber Actinobacillus pleuropneumoniae herausgestellt haben. Ein Hampshire-Eber und zwei Deutsche-Landrasse-Sauen aus einer Actinobacillus pleuropneumoniae-empfänglichen Population wurden verpaart, um die F1-Generation, bestehend aus 21 Tieren, zu erzeugen. Neun der F1-Tiere, zwei Eber (je ein Abkömmling pro F0-Sau) und 7 Sauen wurden so gekreuzt, dass ausschließlich Halbgeschwister zusammentrafen. Die F2-Generation bestand aus 17 Würfen mit insgesamt 170 Tieren. Die Größe der Stichprobe ist nach einer Power-Analyse (Cohen 1988) ausreichend, um einen mittleren Effekt bei einem  $\alpha$ -Fehler von 5% und einer Power von 1- $\beta$  = 0,99 zu finden. Die Poweranalyse wurde mit G-POWER Version 3.1.7 berechnet (Faul et al. 2009). Alle F2-Tiere wurden in der Klinik für Kleine Klauentiere und Schweine der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover geboren, unter standardisierten Bedingungen gehalten und verblieben dort bis zur Euthanasie. Nach einer Säugezeit von 4 Wochen wurden alle Tiere auf eine standardisierte Diät umgestellt. Im Alter von 7 Wochen wurden die Tiere mithilfe eines mehrfach erprobten (Baltes et al. 2001; Tonpitak et al. 2002; Hoeltig et al. 2009) Aerosolverfahrens mit Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) Serotyp 7 infiziert. Vor Beginn dieses Versuches wurden alle Tiere auf die Abwesenheit bestimmter Erreger (Actinobacillus pleuropneumoniae, Mycoplasma hyopneumoniae, PRRSV, Influenza A) getestet. Dies geschah mittels ApX II A- und ApX IV A-ELISA (APP), Antikörper-ELISA (Mycoplasma und PRRSV), bzw. Hämagglutinations-Hemm-Test (Influenza A) (Höltig et al. 2009). Um weiterhin sicherzugehen, dass nur gesunde Tiere in die Studie einbezogen wurden, erfolgte die Haltung gemäß Sicherheitsstufe 2. Im Folgenden wurde der klinische Status aller Tiere von Tag 1 (Infektion) bis Tag 7 (Euthanasie) erhoben. Eine spezielle klinische Untersuchung des Respirationstraktes wurde durch bildgebende Verfahren (Ultraschall und Röntgen), Labordiagnostik (Pulsoxymetrie) und eine pathologische Untersuchung ergänzt, um eine umfassende Beurteilung des Lungenstatus zu ermöglichen. Für weitere Details siehe Hoeltig et al. (2009). Nach Gewinnung genomischer DNA aus Blut, Leber und Milz wurde eine Auswahl von 170 informativen Markerloci bei den F2-Tieren bestimmt, um eine QTL-Analyse durchführen zu können. Zusätzlich wurden eine Genexpressionsanalyse und eine eQTL-Analyse durchgeführt. Genomische DNA für alle Untersuchungen, die im Zuge dieser

Dissertation durchgeführt wurden, wurde durch Extraktion aus Blut, Leber und Milzproben o.g. Tiere gewonnen.

# 3.2 Laborgeräte

- Zentrifuge (Biofuge® fresco, Heraeus, Hanau; Micro Centrifuge. SD 220, Roth, Karlsruhe)
- Kugelmühle (MM 300, Retsch, Haan)
- Vortexer (Vortex Genie 2, VWR Darmstadt)
- Thermomixer (HLC MKR 13, HLC Biotech Bovenden)
- Magnetschüttler für Mikrotiterplatten (Variomag Monoshake®, Life Technologies™, Carlsbad, USA)
- Thermocycler T *personal* und T *gradient* (Biometra, Göttingen)
- Spannungsversorgung (Whatman PS 304, Biometra, Göttingen)
- Gerät zur digitalen Geldokumentation (BioDocAnalyze Ti5, Biometra, Göttingen)
- Elektrophoresekammer (Horizon® 58, Life Technologies<sup>™</sup>, Carlsbad, USA)
- Mikrotiterplatte (Nunc, Denmark)
- Photometer (Ultrospec<sup>™</sup> 1100 pro, GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St. Giles, UK)
- Photometer (NanoDrop 1000, PEQLAB, Erlangen)
- Vakuumpumpe (Laboport, KNF Lab, Freiburg)
- Pyrosequenzierer (Pyro Mark<sup>™</sup> ID Biotage<sup>®</sup>, Uppsala, SE); inkl. Zubehör:
- Pyro Mark<sup>TM</sup> Vacuum Preparation Tool, Biotage®, Uppsala, SE)
- Wärmeschrank (UM 400, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Mikrowelle (HF 1210, Siemens, München)

# 3.3 Chemikalien

- RNAse freies Wasser (Analytik Jena)
- 2x Multiplex Mastermix Kit (Qiagen, Hilden)
- Instant Virus RNA Kit (Analytik Jena/ Biometra, Jena)
- Orange G (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Saccharose ( Roth, Karlsruhe)
- SeaKem® LE Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf)

- 100 bp Marker (Applichem, Darmstadt)
- Midori Green Advance (Biozym, Hessisch Oldendorf)
- Ethidiumbromid 10 mg/ml (Roth, Karlsruhe)
- EDTA- Ethylendiamintetraacetat Dinatrium Salz (Roth, Karlsruhe)
- Tris (Roth, Karlsuhe)
- Essigsäure (Roth, Karlsruhe)
- 1x TAE (= 40 mM Tris, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA)
- 1x TE pH 8,0 (= 10 mM Tris, 1mM EDTA)
- Fast AP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase), (Fermentas/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- Exonuclease I (Fermentas/ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
- Pyro Mark® Gold Q96 (Qiagen, Hilden)
- Streptavidin Sepharose<sup>™</sup> (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, SE)
- Binding Buffer (Biotage®, Uppsala, SE)
- Washing Solution LS (Analytik Jena)
- Washing Solution HS (Analytik Jena)
- Binding Solution RBS (Analytik Jena)
- Lysis Solution RL (Analytik Jena)
- 5x Annealing Puffer pH 7,6 (= 100 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat)
- Waschpuffer pH 7,6 (= 10mM Tris-Acetat)
- Auftragspuffer (= 0,3 g Orange G, 25 g Saccharose, ad 100 ml mit Aq. Bidest.)
- 1,5 % Agarosegel (100 ml) mit Farbstoffkonzentration 0,5 µg /ml
  - 1,5g Agarose
  - 100 ml 1x TAE
  - 5 µl Ethidiumbromid bzw. Midori Green Advance

# 3.4 EDV-Programme und Datenbanken

- Oligo Primerdesign (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)
- PSQ<sup>™</sup> Assay Design Software (Biotage<sup>®</sup>, Uppsala)
- ApE v1.17 for Windows (Davis; 2009)
- Bio Edit (© T. Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad)
- PyroMark ID Software (Biotage®, Uppsala)

- GridQTL Version 3.30 (Seaton et al; 2006)
- G-Power Version 3.1 (Faul et al. 2009)
- <u>http://www.endmemo.com/bio/gc.php</u> (DNA/RNA GC Content Calculator)
- <u>www.ensembl.org</u> (WTSI/EBI, Hinxton, UK)
- <u>www.ncbi.nlm.nih.gov/</u> (NCBI, Bethesda, USA)

# 3.5 URL beim Download am 09.09.2012 (zuletzt geprüft am 24. 12. 14):

- <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/Nw\_003611713</u> (Transferrin)
- <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW\_003611790</u> (Transferrin- Rezeptor)
- <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\_010455</u> (IL12 A, MYD88, RUNX1)
- <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW\_001885219</u> (AHSG)
- <u>http://www.ensembl.org/Sus\_scrofa/Gene/Sequence?g=ENSSSCG00000011640;r=13:</u> 82429036-82469005;t=ENSSSCT00000012740 (Transferrin)
- <u>http://www.ensembl.org/Sus\_scrofa/Gene/Sequence?g=ENSSSCG00000011848;r=13:</u> <u>143408460-143437991</u> (Transferrin- Rezeptor)
- <u>http://www.ensembl.org/Sus\_scrofa/Gene/Sequence?db=core;g=ENSSSCG00000011</u> 251;r=13:25181051-25185351 (MYD88)
- <u>http://www.ensembl.org/Sus\_scrofa/Gene/Sequence?g=ENSSSCG00000011730;r=13:</u> <u>108066792-108074477</u> (IL12 A)
- <u>http://www.ensembl.org/Sus\_scrofa/Gene/Sequence?g=ENSSSCG00000011799;r=13:</u> 133821645-133828630;t=ENSSSCT00000012911 (AHSG)
- <u>http://www.ensembl.org/Sus\_scrofa/Gene/Sequence?g=ENSSSCG00000012051;r=13:</u> 208204968-208304419;t=ENSSSCT00000013183 (RUNX1)

# 3.6 In silico-Recherche

Als Grundlage für das Primerdesign dienten Sequenzen aus den in Kap. 3.4 aufgeführten Datenbankeinträgen. Die von NCBI und Ensembl publizierten Nukleotidsequenzen wurden gegenübergestellt, um die Lage der Exons, der 3'- und 5'-UTR sowie der Promotorregion abzugleichen. Bevor die ausgewählten Kandidatengene sequenziert wurden, wurde vorab das Vorliegen neun ausgewählter SNPs im Transferrin-Gen und eines SNP im Transferrin-Rezeptor Gen untersucht, da sie, mit Ausnahme des TFRC-SNP einen Aminosäure-Austausch zur Folge haben und daher als geeignete Kandidaten für eine kausale Mutation eingestuft

wurden. SNPs in diesen beiden Genen wurden ausgewählt, da hierzu schon Studien von Danilowicz et al. (2009) und Wang et al. (2007) vorlagen.

|     | Klinische Merkmale            |     | eQTL-Gene |     |              |
|-----|-------------------------------|-----|-----------|-----|--------------|
|     |                               |     |           |     |              |
| 1.  | Infektionstod                 | 18. | MS4A4A    | 38. | PPIF         |
| 2.  | Sektionsscore                 | 19. | TIMP1     | 39. | AEN          |
| 3.  | Reisolierungsscore            | 20. | SOD2      | 40. | GK           |
| 4.  | SeRI                          | 21. | SOD2      | 41. | IGFBP3       |
| 5.  | Sonographiescore (0dpi)       | 22. | CHI3L1    | 42. | CTPS         |
| 6.  | Sonographiescore (7dpi)       | 23. | CCL19     | 43. | LOC100132553 |
| 7.  | KlinischerScore (7dpi)        | 24. | TCN1      | 44. | IGHα         |
| 8.  | Röntgenscore (7dpi)           | 25. | CXCL6     | 45. | GK           |
| 9.  | RespiratoryHealthScore        | 26. | NPM3      | 46. | TMEM158      |
| 10. | Klin.Score (KS) gesamt (1dpi) | 27. | CTSL2     | 47. | IGFBP3       |
| 11. | Ksges (2dpi)                  | 28. | SOD2      | 48. | RAB6B        |
| 12. | Ksges (3dpi)                  | 29. | CRABP1    | 49. | ARG2         |
| 13. | Ksges (4dpi)                  | 30. | UPK1B     | 50. | LOC100291908 |
| 14. | Ksges (5dp)i                  | 31. | CYP1B1    | 51. | TF           |
| 15. | Ksges (6dpi)                  | 32. | SLC39A14  | 52. | S100A9       |
| 16. | Ksges (7dpi)                  | 33. | DARC      | 53. | UCK2         |
| 17. | L0H1                          | 34. | CSF2RB    | 54. | n.n.         |
|     |                               | 35. | CD163     | 55. | TFRC         |
|     |                               | 36. | IL1RN     | 56. | SFTPD        |
|     |                               | 37. | CFB       | 47. | STAT3        |

**Tab. 1: Phänotypen für die QTL- Analyse**. Übersicht über die als Phänotypen in der QTL-Analyse eingesetzten klinischen Merkmale und eQTL. Rot: Cis-eQTL; Abkürzungen: SeRi: Kombination aus Sektionsscore und Reisolierungsscore; L0H1: Merkmal umfasst den RHS *(Respiratory Health Score)* der 50 am stärksten und 50 am wenigsten betroffenen Tiere; UPK1B: Uroplakin 1B; LOC: Locus; RAB6B: Ras-related Protein; TF: Transferrin; TFRC: Transferrin Rezeptor

# 3.7 Auswahl der klinischen Phänotypen

Der Phänotyp der F2-Tiere wurde mithilfe klinischer, klinisch-chemischer, bakteriologischer und pathologischer Untersuchungen bestimmt (Höltig et al. 2009). Es wurden nur die phänotypischen Daten in die QTL-Analyse mit einbezogen, die für das Merkmal Krankheitsresistenz gegenüber *Actinobacillus pleuropneumoniae* von besonderer Bedeutung sind (Tab.1).

## 3.8 Auswahl der eQTL

Eine Expressionsanalyse wurde an den im RHS am stärksten differierenden 100 Tieren mithilfe eines SNP-Chips durchgeführt (Reiner et al. unveröffentlicht). In dieser Arbeit wurden nur auf SSC13 lokalisierte cis-eQTL in der QTL-Analyse berücksichtigt (Tab.1).

## 3.9 Primerdesign

Da das Ziel der PCR in der Amplifikation der Exons, der 3'- und 5'-UTR und dem Promotor der Kandidatengene lag, wurden die Primer in flankierende Regionen gelegt. Geachtet wurde darauf, dass Forward- und Reverse-Primer möglichst mindestens 40bp von der zu analysierenden Sequenz entfernt liegen. Mithilfe des Programmes Oligo wurden die Primer ausgewählt. Sie wurden hinsichtlich Annealing-Temperatur und physikalisch-chemischen Parametern (Selbstkomplementarität, Primer-Dimere) optimiert. Die Annealing-Temperatur beider Primer sollte nicht mehr als +/- 1°C voneinander abweichen. Die Amplifikatlänge sollte 200 bp nicht unter,- bzw. 1200 bp nicht überschreiten. Zum besseren Anheften der Primer wurde das 3'-Ende so gelegt, dass sich dort ein oder zwei Guanin(e) und/oder Cytosin(e) befanden.

# 3.10 Primer

| Primer-     | Primersequenz                     | Länge | Opt. Annealing |
|-------------|-----------------------------------|-------|----------------|
| Bezeichnung | (5 <sup>`</sup> →3 <sup>`</sup> ) | (bp)  | T(°C)          |
| AHSG-1F     | GTC CCC TCC TCC CTT GGT ATT TG    | 23    | 61,4           |
| AHSG-1R     | CAG ATA CTC ACT GTT GGG CCT GG    | 23    |                |
| AHSG-2F     | CTC CTC TCT GCT GCT GTT AC        | 20    | 60,5           |
| AHSG-2R     | ACA AAA GTG AAG AAA GAG AAG TG    | 23    |                |
| AHSG-3F     | CTA TCC TAC CCC ACC TTA CTC TGC   | 24    | 62,1           |

In Tab. 2 sind sämtliche für die Amplifikation der zu untersuchenden DNA-Sequenzen benötigte Primer aufgeführt.

| Primer-     | Primersequenz                     | Länge | Opt. Annealing |
|-------------|-----------------------------------|-------|----------------|
| Bezeichnung | (5 <sup>°</sup> →3 <sup>°</sup> ) | (bp)  | T(°C)          |
| AHSG-3R     | TGT TGT TTG GTT GGC ATT TGA C     | 22    |                |
| AHSG-4F     | AAT GCC AAC CAA ACA ACA ATA AC    | 23    | 61,9           |
| AHSG-4R     | GTT TGT TTG TTT GTT TGT TTC AGT G | 25    |                |
| AHSG-5F     | CCT CTG CTC TGA ATG ATG           | 18    | 55,8           |
| AHSG-5R     | TAT TTA TAT TGT GAG GCT CG        | 20    |                |
| AHSG-6FW    | GCC TGT GGT CCT GCA GCC           | 18    | 62,9           |
| AHSG-6R     | GCC AAA TCT GCG ACC TAC ACC       | 21    |                |
| AHSG-7F     | ATC TTT CCT GTT TTG GTT CAT AG    | 23    | 56,0           |
| AHSG-7R     | CTA AGC AAA CCA AAT AAA GTA AAA C | 25    |                |
| MYD3`-1F    | ACT ACA CCA ACC CCT GCA CCA AG    | 23    | 64,6           |
| MYD3'-1R    | CAG AAG CTG AAC CCA GGG AAA TG    | 23    |                |
| MYD3`-2F    | CTC CTG CCC CAA AGC CTG           | 18    | 61,4           |
| MYD3`-2R    | TGC TTC CAA ACT CCA TCC AGA C     | 22    |                |
| MYD-1F      | AGG GCA GGA CCG TAT GAA C         | 19    | 64,9           |
| MYD-1R      | CGG CTA TTG AAA GAG GGA AC        | 20    |                |
| MYD-2F      | GAG AGA GAC ACA CAA GCC TGA AC    | 23    | 61,6           |
| MYD-2R      | TGC CAA ACC CAG AGA TAA GAC TAC   | 24    |                |
| MYD-3F      | GGG GTA GGG TGC TCA TCT TTC       | 21    | 63,1           |
| MYD-3R      | ACT TGC TGC TGC CTG TTC TG        | 20    |                |
| IL-1F       | ACA GCC TCA TCA TCC ACT CC        | 20    | 63,0           |
| IL-1R       | CCC CTT TCT TTT TCC TCT GC        | 20    |                |
| IL-2F       | CTT CGT CAC TCC ACT GTT TCC       | 21    | 60,6           |
| IL-2R       | AAA ACC TGA AAA AAA TGA CTG ATG   | 24    |                |
| IL-3F       | GCG GGA GAG AGA GTG TAA ATG TC    | 23    | 59,8           |
| IL-3RW      | CCC AGG AGC ATG TAT ATT TTT GG    | 23    |                |

| Primer-     | Primersequenz   | Länge | Opt. Annealing |
|-------------|---|-------|----------------|
| Bezeichnung | (5 <sup>`</sup> →3 <sup>`</sup> )                                 | (bp)  | T(°C)          |
| IL-3XFW     | CTA GAA TGA GAG TTG CCT GGC TG                                    |       | 56,8           |
| IL-3XRW     | CCT CAC TTA CCC TGC CAC TGC                                       | 21    |                |
| IL-3YFW     | GCT CAT CTC ATT GGT CCC TTC C                                     | 22    | 61,4           |
| IL-3R       | CTC TAC AGG GTG CTC TCA AGG C                                     | 22    |                |
| IL-4F       | AGG TGT AGG AGA TGG AAT GAG                                       | 21    | 55,2           |
| IL-4R       | CAG ATG TTA AAC AAA AAT CAC AG                                    | 23    |                |
| RUNX5`-F    | AAT ATA ATT TGG AAT CTC AC  | 20    | 48,9           |
| RUNX5`-R    | TTT ATA CTT GCA TTC ATT C   | 19    |                |
| RUNX-1FW    | TGT CAA AGC AAG AAA GAA GCA AG                                    | 23    | 61,6           |
| RUNX-1R     | CCA CAG CAA CTC CCC CAC   | 18    |                |
| RUNX-2FW    | TGG TGG GGG AGT TGC TG  | 17    | 65,7           |
| RUNX-2RW    | GAG TAG GAG GCG TGG CTT C   | 19    |                |
| RUNX-3F     | CTC ACT GCT TTG GCT TTT TG  | 20    | 60,6           |
| RUNX-3R     | GCA GAA AAA GGA AAG AAA GTA GC                                    | 23    |                |
| RUNX-4F     | TGT TTT CCA GCC AAG CAG GTG AG                                    | 23    | 65,9           |
| RUNX-4R     | CTC CCT CCC ACC ATC ACC ACC                                       | 21    |                |
| RUNX-5F     | ACG ATT TTG ATG TCT GCC AC  | 20    | 55,4           |
| RUNX-5R     | TGA ATC TCT CTT GAC CCT GG  | 20    |                |
| RUNX-6F     | ATA GAA C GAC TTT TGA TTG CTA TTC CAT<br>TG GG CAC TGA TGA AAT AG | 23    | 56,7           |
| RUNX-6R     | GAC TTT TGA TTG CTA TTC CAT TG                                    | 23    |                |
| RUNX-7FW    | CGA GTA CCT TGA AAG CGA TG  | 20    | 62,6           |
| RUNX-7R     | ATT ATG TGT TTG CTG GTT CTT G                                     | 22    |                |
| RUNX-8F     | GAA TCC AAA GTC AAG TGC CAA AG                                    | 23    | 58             |
| RUNX-8R     | CAA CAT CCC CAA ACC CGA G   | 19    |                |

| Primer-                                    | Primersequenz                      | Länge | Opt. Annealing |
|--|------------------------------------|-------|----------------|
| Bezeichnung                                | (5 <sup>`</sup> →3 <sup>`</sup> )  | (bp)  | T(°C)          |
| RUNX-9F AGG TCT TGC TTC TAA TGT ATG TG     |                                    | 23    | 59,9           |
| RUNX-9RW                                   | ATT TCC AGG CAC TCT CAT TC         | 20    |                |
| TFRC-1F                                    | TTT TTC TTT CTT TTT TTG TCT TTC    | 24    | 56,0           |
| TFRC-1R                                    | ACC ACC ACT TCA AAT GTA AAT G      | 22    |                |
| TFRC-2F                                    | GAA GAA TGC TGG TTT GAA GAG AC     | 23    | 58,0           |
| TFRC-2R                                    | AAG ATG AAA AAG GCT ACT GAT GC     | 23    |                |
| TR-3FWX                                    | GGA TGC TGA ATG AAG ATT ATG        | 21    | 55,1           |
| TR-3RW                                     | TAA CCC ACT GAG CAA AGC            | 18    |                |
| TR-3FWY                                    | TGC TGA AAA CTC GGT GAC            | 18    | 56,3           |
| TFRC-3R                                    | GAG CAA AGA GGA GAG CAG TAG        | 21    |                |
| TFRC-4F                                    | TAT TTC ATT ATC CTT TCT CTT TC     | 23    | 55,2           |
| TFRC-4R                                    | GTT CAA AAG ATA AAA TAA TAA AGT C  | 25    |                |
| TFRC-5F                                    | AAG CAA GTA TTT TTT TTT CTA AC     | 23    | 54,9           |
| TFRC-5R                                    | CCA GTT GTT TTA AGG TGT TAT C      | 22    |                |
| TFRC-6F                                    | ATA TGT CCT CTT AAC CTA GAA CTT C  | 25    | 56,2           |
| TFRC-6R                                    | AAA GGC AGA TAC AAC AAA AGA C      | 22    |                |
| TFRC-7F                                    | GGA GGC ATA GAA GAG TGA GGT CG     | 23    | 58,5           |
| TFRC-7R                                    | CCC CCA AAA ACC TCA AAC AAA C      | 22    |                |
| TFRC-8F                                    | GGA TAA ACT GTC TGA ATG AAC TG     | 23    | 56,7           |
| TFRC-8R                                    | TTT GGT TTC TTC CTT CAT AGC        | 21    |                |
| TFRC-9F                                    | GGA AGA AAC CAA AAA CAA GAT        | 21    | 56,2           |
| TFRC-9R                                    | AAA ATC ATC ATA CAT AAC CTA AGA AG | 26    |                |
| TFRC-10F                                   | CAG GGA AGA GAA CAA AGG ATA C      | 22    | 58,2           |
| TFRC-10R   TTT ATT TTT TTT GGT CTT TTT AGG |                                    | 24    |                |
| TFRC-11FW                                  | GAA AGG TAT ACA GAA TGA CAT CC     | 23    | 55,1           |

| Primer-                                   | Primersequenz                  | Länge | Opt. Annealing |
|---|--------------------------------|-------|----------------|
| Bezeichnung                               | (5`→3`)                        | (bp)  | T(°C)          |
| TFRC-11RW                                 | ACC AAT TAA AAA TGA ACA CTT G  | 22    |                |
| TFRC-12F   AAC ATT GGA AGA TTA GTA GCC TG |                                | 23    | 57,6           |
| TFRC-12R                                  | GGT CTC CTC TTT TCA TAA TCT TG | 23    |                |
| TF-1R                                     | GAG CAG CAG GTG TGG GAG G      | 19    |                |
| TF-2F                                     | TCA GTG GGA AAA TAA GAG GTC    | 21    | 59,5           |
| TF-2R                                     | CGC CTA CAT GGT CAT TTT G      | 19    |                |
| TF-3F                                     | TCA CAA GGG AAA AGA GAA GAA TG | 23    | 61,5           |
| TF-3R                                     | TGC TCC TAC TAC CTT CCC TTT G  | 22    |                |
| TF-4F                                     | TCC TTT TCT ACA ACC CAA CTC    | 21    | 61,7           |
| TF-4R                                     | GAC TCT CTG TGA GGG AAT TAG G  | 22    |                |
| TF-5F                                     | TTA TCC TCC ACC AGA AGT TTG    | 21    | 61,9           |
| TF-5R                                     | CTG TGC AAC TCT GAG AAG GC     | 20    |                |
| TF-6F                                     | TCT TGT CCA GCC TTC CCA TC     | 20    | 61,2           |
| TF-6R                                     | CCA AGT TCA ATT CCT GAG CAG AG | 23    |                |
| TF-7F                                     | TGA GCA GGT GTC CAT TTA TTC    | 21    | 59,8           |
| TF-7R                                     | AAA TGT GGA ATG CTC TTG TAA TC | 23    |                |
| TF-8F                                     | TGA CCA AGC ACT GAA ATA ACA C  | 22    | 60,3           |
| TF-8R                                     | AAG AAA GAA CCA GGG AAA CTA TC | 23    |                |
| TF-9F                                     | AGA GAG GAG ATG GGA AGT CAC AG | 23    | 59,7           |
| TF-9R                                     | CAC TGC CAA TTA CTC TCC TTC C  | 22    |                |
| TF-10F                                    | TTC TTC TTA TCG CAA AAC ATC G  | 22    | 58,8           |
| TF-10R                                    | AAT AAG GTG CCC TGT ACT TCA G  | 22    |                |
| TF-11FW                                   | CAT GAC GGG ACC TCC AAC TAT G  | 22    | 61,4           |
| TF-11RW                                   | TAA GAC TCA CCT GAA AGC CCC T  | 23    |                |
| TF-12F                                    | TGA TGG TGG TAT TGT AAC TGA AC | 23    | 59,7           |

| Primer-     | Primersequenz                     | Länge      | Opt. Annealing |
|-------------|-----------------------------------|------------|----------------|
| Bezeichnung | (5`→3`)                           | (bp) T(°C) |                |
| TF-12R      | CCC AAA CAG ATT CGT GAT G         | 19         |                |
| TF-13F      | AAG GGG CTG AGG AGA GGG AAT G     | 22         | 63,2           |
| TF-13R      | TGT GAG GAA AAT GAG GGT ACA GCA G | 25         |                |
| TF-14R      | AAG AAC TCT CTG CAA TCC TGG       | 21         |                |
| TF-15F      | AAG CCT CAC CCA TAA GAC ACA AG    | 23         | 60,3           |
| TF-15R      | TTT AGC AAG AAG AGG TCC CAG TG    | 23         |                |

**Tab. 2: Auflistung aller verwendeten Primer.** Primerbezeichnung: Genkürzel, fortlaufende Nummer, F: Forward, R: Reverse; Primersequenz: in Ableserichtung der DNA-Polymerase; Länge: in Basenpaaren; Optimale Anheftungstemperatur für DNA-Polymerase: in °C

## 3.11 Photometrische Bestimmung der Primerkonzentration

Alle Primer wurden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) hergestellt und in Form von Lyophilisaten geliefert. Durch Zugabe eines angegebenen Volumens 1x TE wurden die Primer resuspendiert. Ihre Extinktion wurde anschließend am Photometer (Ultrospec 1100pro) gemessen. Hierzu wurden von jeder Primersuspension 5  $\mu$ l in 395  $\mu$ l 1x TE gegeben. Das entstandene Gesamtvolumen von 400  $\mu$ l wurde in eine Küvette gefüllt und die Extinktion bei den Wellenlängen 230, 260, 280 und 320 nm gemessen. Die Konzentration errechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

# c = E/(e x d) x VF

(c: Konzentration in µmol/l, E: Extinktion bei 260 nm, e: Extinktionskoeffizient,

d: Schichtdicke Küvette, VF: Verdünnungsfaktor)

Da bei Oligonukleotiden der Extinktionskoeffizient von deren Basenzusammensetzung abhängig ist, wurde er für jeden Primer gesondert nach folgender Formel berechnet:

# e = (15200 x #A) + (7050 x #C) + (12010 x #G) + (8400 x #T)

(mit #A = Anzahl A-Nukleotide, #C = Anzahl C-Nukleotide, #G = Anzahl G-Nukleotide und #T = Anzahl T-Nukleotide des Oligonukleotids)

#### **3.12 DNA- Extraktion**

Die DNA-Extraktion erfolgte mithilfe des Instant Virus RNA Kits (Analytik Jena/Biometra). Aus dem vorhandenen Probenmaterial wurde ein ca 1 mm<sup>3</sup> (25-50 mg) großes Stück in 450 µl RL-Puffer überführt. Zur Erhöhung der DNA-Ausbeute wurde zu dem Gewebestück eine Stahlkugel mit 5 mm Durchmesser gegeben und für 2 min in der Kugelmühle bei 25 Hz zerkleinert. Danach folgte eine 30 minütige Inkubationsphase auf dem Thermomixer bei 22°C mit 1000 Schüttelbewegungen/min. Durch die anschließende Zentrifugation (16000 x g, 1 min) setzten sich die noch vorhandenen Festbestandteile ab. Von dem generierten Überstand wurden 350 µl mit der gleichen Menge an RBS-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß umgefüllt und gründlich auf dem Vortexer gemischt. Von der so erhaltenen Mischung wurden 650 µl auf eine Zentrifugationssäule pipettiert und zentrifugiert (12000 x g, 1 min). Danach folgten zwei Waschschritte; im ersten Waschschritt wurden 500 µl Hochsalzpuffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert (12000 x g, 1 min) im zweiten Waschschritt die gleiche Menge Niedrigsalzpuffer und dann zentrifugiert (16000 x g, 3 min). Die Zentrifugationssäule wurde nach dem Waschen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß umgesetzt. Auf die an die Membran der Zentrifugationssäule gebundene DNA wurden 60 µl H<sub>2</sub>O pipettiert. Nach einer Wartezeit von 3 min zum Lösen der DNA wurde erneut zentrifugiert (6000 x g, 1 min) und somit die DNA-haltige Lösung in das Eppendorfgefäß eluiert.

## 3.13 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Um so wenig wie möglich extrahierte DNA für die Konzentrationsbestimmung zu verbrauchen, wurde die Messung an einem NanoDrop 2000 durchgeführt, da hier lediglich 1  $\mu$ l der extrahierten DNA benötigt wird. Für die PCR wurde die DNA-Konzentration auf 50 ng/ $\mu$ l eingestellt. Zur Verdünnung der DNA wurde 1x TE verwendet.

#### 3.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Exons, 3'- und 5'-UTR sowie Teile der Promotorregion der Kandidatengene wurden mittels PCR amplifiziert (Tab. 3). PCR Reaktionen mit Primerpaaren, die unterschiedliche optimale Annealingtemperaturen hatten, wurden in einem Gradientencycler (T *gradient*, Biometra) durchgeführt. Der Standard-PCR Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 10 µl 2x Master-Mix (Qiagen)
- 7 µl RNAse freies Wasser bzw. alternativ 5 µl RNAse freies Wasser + 2 µl Q-Solution
- 2 µl Primermix (Forward- und Reverse-Primer, Endkonzentration: 0,4 µM)
- 1 µl DNA (50 ng/µl)

Bei einem G/C-Gehalt der DNA-Fragmente von 50% oder mehr wurden dem PCR-Ansatz 2 µl Q-Solution zugesetzt, um das Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges zu erleichtern.

| Schritt | Temperatur (°C)      | Dauer (min) | Phase                          |
|---------|----------------------|-------------|--------------------------------|
| 1.      | 95                   | 15          | Aktivierung der DNA-Polymerase |
| 2.      | 95                   | 0,5         | Denaturierung                  |
| 3.      | Optimale Annealing-T | 1,5         | Annealing                      |
| 4.      | 72                   | 0,5         | Extension                      |
| 5.      | 72                   | 10          |                                |
| 6.      | 4                    | x           |                                |

 Tab. 3: PCR-Programm. Schritte 2 bis 4 werden 35x wiederholt.

# 3.15 Agarose-Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob eine spezifische Amplifikation der DNA-Region stattgefunden hat, erfolgte eine Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurden 2  $\mu$ l PCR-Produkt mit 2  $\mu$ l Auftragspuffer gemischt und hiervon 3  $\mu$ l in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 120 Volt für 15 min durchgeführt. Danach wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und das Foto archiviert. Zur Größenbestimmung wurde eine 100 bp-Leiter mitgeführt.

Alle DNA-Proben wurden durch die Firma LGC Genomics GmbH, Berlin sequenziert. Größere, zeitnah zur Sequenzierung anfallende Probenmengen wurden in Mikrotiterplatten verschickt; wenige Proben zur Einzelsequenzierung versendet.

## a. Mikrotiterplatte (96 well)

Eine Mikrotiterplatte wurde mit 10-20  $\mu$ l unbehandeltem PCR-Produkt befüllt. Eine zweite, korrespondierende Platte enthielt die gleiche Menge an Sequenzierungsprimer mit einer Konzentration von 5  $\mu$ M.

## b. Einzelsequenzierung

Die noch in den PCR-Produkten vorhandenen Primerreste und Nukleotide mussten zunächst enzymatisch abgebaut werden, um die Sequenzierung nicht zu beeinträchtigen.

Zu 8,5  $\mu$ l PCR- Produkt wurden 1  $\mu$ l Fast AP und 0,5  $\mu$ l Exonuklease I zugesetzt. Durch Erhitzen auf 37°C für 30 min wurden die Primerreste durch die Exonuklease verdaut und die Nukleotide durch die Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Durch anschließende Inkubation bei 80°C für 15 min wurde das Enzymgemisch deaktiviert. Von der so vorbehandelten Probe wurden 10  $\mu$ l zusammen mit 4  $\mu$ l des entsprechenden Sequenzierungsprimers (5  $\mu$ M) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gefüllt und versandt.

# 3.16 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist ein 1996 auf Grundlage der Biolumineszenz entwickeltes Verfahren nach dem "Sequencing by Synthesis"-Prinzip (Ahmadian et al. 2006). In einer vorher festgelegten Dispersionsreihenfolge werden die Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) zu einem immobilisierten Einzelstrang hinzugegeben, sodass ein komplementärer Strang synthetisiert werden kann. Bei Bindung eines Nukleotids an den Leitstrang wird eine Enzymkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende die Emission von Licht proportional zur Anzahl der gebundenen Nukleotide steht (Ronaghi 2001). Da die Sequenz des Matrizenstranges somit eindeutig bestimmbar ist, eignet sich die Pyrosequenzierung besonders zur Detektion von SNPs und zur Sequenzierung von kurzen DNA-Abschnitten (Fakruddin und Chowdhury 2012).

Zur Durchführung einer Pyrosequenzierung bedarf es folgender Arbeitsschritte:

# 1. PCR

Die zu sequenzierenden DNA-Abschnitte der 170 F2-Tiere mussten zunächst amplifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden mithilfe der Software PSQ Assay Design zwei PCR-Primer (Forward und Reverse) und ein Sequenzierungsprimer entwickelt. Der dem Sequenzierungsprimer gegenläufige PCR-Primer wurde biotinyliert. Der Sequenzierungsprimer wurde so gewählt, dass sein 3`-Ende ein bis drei Nukleotide vor dem zu untersuchenden SNP an den Leitstrang hybridisiert. Alle Primer wurden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) hergestellt. Das weitere Vorgehen gestaltete sich wie folgt:

- Optimierung der Annealing-Temperatur mithilfe von Test-DNA
- Durchführung der PCR mit den DNA-Proben der 170 F2-Tiere bei optimaler Annealing-Temperatur (nach Standard-Protokoll)
- Stichprobenartiges Auftragen der PCR-Produkte auf Agarosegel zur Erfolgskontrolle

# 2. Immobilisierung der PCR-Produkte

In zwei Mikrotiterplatten mit jeweils 96 Wells wurden pipettiert:



Die PCR-Platte wurde danach für 5 min auf einem Magnetschüttler für Mikrotiterplatten bei 1500 rpm geschüttelt. Durch diesen Schritt wurden die biotinylierten PCR-Produkte an den mit Streptavidin überzogenen Sepharose-Beads fixiert.

# 3. Abtrennung des nicht-biotinylierten DNA-Stranges

Um die an die Sepharose-Beads gebundene doppelsträngige DNA zu denaturieren und die nicht-biotinylierten Einzelstränge zu separieren erfolgte eine weitere Verarbeitung der Proben mit dem PyroMark<sup>™</sup> Vacuum *Preparation Tool*:

- Spülung des Preparation Tools mit Aq.bidest. für 20 s
- Aufsaugen der Sepharose-Beads aus der PCR-Platte in die Mikrokapillaren des *Preparation Tools* Waschung der Sepharose-Beads mit 70% Ethanol
   Denaturierung der an die Sepharose-Beads gebundenen Doppelstrang-DNA
   durch 0,2 M NaOH und gleichzeitige Entfernung des nicht-biotinylierten
   Einzelstranges
- Neutralisierung der Sepharose-Beads durch Spülen mit Waschpuffer
- Überführen der Sepharose-Beads mit immobilisierter einzelsträngiger DNA in die Primer-Platte (siehe oben)

# 4. Anheftung des Sequenzierungs-Primers

Um die Hybridisierung des Sequenzierungs-Primers an den DNA-Einzelstrang zu ermöglichen, erfolgte erst eine zweiminütige Inkubation der Primer-Platte bei 80°C, danach deren Abkühlung auf Raumtemperatur.

# 5. Bereitstellung der Reagentien

Nach Eingabe der Versuchsdaten in die Pyrosequenzierer-Software wurden die angezeigten Volumina an Enzymmix (beinhaltet DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Apyrase und Single-Strand-Binding-Protein), Substratmix (beinhaltet Adenosin-5`-Phosphosulfat (APS) und Luciferin) und Nukleotiden (dNTPs) in die Kartusche pipettiert. Nach Bestückung des Pyrosequenzierers mit Kartusche und Primer-Platte wurde die Sequenzierung gestartet.

# 6. Sequenzierung

Die Abbildungen 2 bis 5 zeigen den Ablauf der Pyrosequenzierungsreaktion:

Zu dem DNA-Matrizenstrang werden nacheinander entsprechend der Dispersionsreihenfolge die jeweiligen Nukleotide eingespritzt. Wird das entsprechende Nukleotid durch die DNA-Polymerase in den neu synthetisierten Strang eingebaut, führt dies zur Freisetzung eines Pyrophosphats (Abb. 2).

$$(DNA-Strang)_n + dNTP \xrightarrow{DNA-Polymerase} (DNA-Strang)_{n+1} + PP_i$$

**Abb. 2:** Anheftung eines Desoxy-Nukleosid-Triphosphats an den DNA-Strang und Abspaltung eines Pyrophosphats. Die Reaktion wird katalysiert durch das Enzym DNA-Polymerase. n: Anzahl Nukleotide des DNA Einzelstrangs, dNTP: Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, PP<sub>i</sub>: Pyrophosphat

Das freigesetzte  $PP_i$  reagiert mit APS mithilfe des Enzyms ATP-Sulfurylase zu ATP und  $SO_4^{2-}$  (Abb.3).

$$PP_{i} + APS \longrightarrow ATP - Sulfurylase \rightarrow ATP + SO_{4}^{2}$$

Abb. 3: Reaktion von Pyrophosphat mit 5'-Adenosin-Phosphosulfat zu Adenosin-Triphosphat und Schwefeloxid. APS: 5'-Adenosin-Phosphosulfat, ATP: Adenosin-Triphosphat

In einem dritten Schritt dient das entstandene ATP als Energielieferant für die Umsetzung von Luciferin in Oxyluciferin unter enzymatischer Wirkung der Luciferase und unter Beteiligung von Luftsauerstoff. Hierbei wird ein Teil der Energie in Licht umgewandelt (Abb. 4). Die Stärke des Lichtsignales ist proportional der Menge an freigesetztem Pyrophosphat und damit der Anzahl der eingebauten Nukleotide.

ATP + Luciferin + 
$$O_2 \xrightarrow{\text{Luciferase}} AMP + PP_i + Oxyluciferin + CO_2 + LICHT$$

**Abb. 4: Entstehung von Licht**. Reaktion von Luciferin unter Energie- und Sauerstoffverbrauch zu Adenosin-Monophosphat, Pyrophosphat, Oxyluciferin, CO<sub>2</sub> und Licht. ATP: Adenosin-Triphosphat, AMP: Adenosin-Monophosphat, PP<sub>i</sub>: Pyrophosphat
Im letzten Schritt wird nicht gebundenes dNTP durch das Enzym Apyrase unter Energieverbrauch in Desoxy-Nukleosid-Monophosphat umgewandelt. Dieses kann dadurch nicht mehr als Substrat für die Polymerase dienen (Abb. 5).

$$ATP + dNTP \longrightarrow Apyrase AMP + dNMP + 4 P_i$$

**Abb. 5: Aufspaltung der übrigen Desoxy-Nukleosid-Triphosphate durch das Enzym Apyrase.** ATP: Adenosin-Triphosphat, AMP: Adenosin-Monophosphat dNMP: Desoxy-Nukleosid-Monophosphat, P<sub>i</sub>: Phosphat

Diese vier Schritte (Abb. 2 bis Abb. 5) werden solange wiederholt, bis die Dispersionsreihenfolge abgearbeitet ist.

#### 3.17 QTL-Analyse und Statistik

Die QTL-Analyse wurde mithilfe der Online-Applikation GridQTL (Seaton et al. 2006) durchgeführt. Als Methode zur QTL-Kartierung wurde Simple Interval Mapping in 1 cM-Schritten mit einer F-Statistik angewendet. Es wurde ein 1-QTL-Modell angenommen, in dem Additiv- und Dominanzeffekte berücksichtigt werden sollten. Jeder SNP wurde zunächst als Marker, in einem zweiten Durchgang als fixer Parameter einbezogen. Zur Schätzung der Grenzen des Konfidenzintervalles (95%) um einen QTL-Peak wurde ein Bootstrapping mit 1000 Iterationen durchgeführt (Visscher et al. 1996). Die F-Schwellenwerte für die chromosomweite Signifikanz wurden mithilfe eines Permutationstests mit 1000 Wiederholungen ermittelt (Churchill und Doerge 1994). Hieraus ergaben sich Schwellenwerte (p= 0,05) von 5,71 für klinische Merkmale bzw. 6,39 für eQTL. Die statistische Auswertung der errechneten QTL-Daten erfolgte mit dem Programm SPSS.

#### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Sequenzierung

Von den neun vorab untersuchten SNPs in den Kandidatengenen Transferrin und Transferrin-Rezeptor war keiner in der DNA der untersuchten Elterntiere (Eber, Sau 173, Sau 366) ausgeprägt. Bei der nachfolgenden Sequenzierung der sechs Kandidatengene wurden insgesamt 43 SNPs (Tab. 4) bei den Elterntieren gefunden. In TF existierten 12, in TFRC 10, in IL12A 3, in RUNX1 2, in AHSG 4 und in MYD88 12 SNPs, die beim Eber und mindestens einer Sau mit unterschiedlichen Allelen vorlagen (Tab.4). Aus diesen SNPs wurden 7 (bei TF, TFRC, AHSG je einer, bei MYD88 und IL12A je zwei) zur Pyrosequenzierung in den 170 F2-Tieren ausgewählt und deren Genotypen ermittelt. Übersichten über die Kandidatengene und die Lage der SNPs innerhalb der Gene zeigen die Abbildungen 6 a-f.

#### AHSG



**Abb. 6a: Übersicht für AHSG**. Grün: Lage der Primer (siehe Tab.2); Blau: Exons, nummeriert; Schwarz: Introns, Abstand zwischen Exons in Basenpaaren; Rot: 3'bzw. 5'UTR; gelbes Dreieck: Lage des SNP; Quelle: National Center for Biotechnology Information, Accession No. NW\_001885219, Gen: 536142-561835. Autor: Swine Genome Sequencing Consortium, 2011





Abb. 6b: Übersicht für IL12. Grün: Lage der Primer; Blau: Exons, nummeriert; Schwarz: Introns, Abstand for Biotechnology Information, Accession No. NC\_010455, Gen: 108066792-108074477. Autor: Swine zwischen Exons in Basenpaaren; Rot: 3'bzw. 5'UTR; gelbe Dreiecke: Lage der SNPs; Quelle: National Center Genome Sequencing Consortium, 2011

## **MYD 88**



Abb. 6c: Übersicht für MYD88. Grün: Lage der Primer; Blau: Exons, nummeriert; Schwarz: Introns, Abstand zwischen Exons in Basenpaaren; Rot: 3'bzw. 5'UTR; gelbe Dreiecke: Lage der SNPs; Quelle: National Center for Biotechnology Information, Accession No. NC\_010455, Gen: 25181100-25183718. Autor: Swine Genome Sequencing Consortium, 2011

RUNX-1





Abb. 6d: Übersicht für RUNX1. Grün: Lage der Primer; Blau: Exons, nummeriert; Schwarz: Introns, Abstand zwischen Exons in Basenpaaren; Rot: 3'bzw. 5'UTR; Quelle: National Center for Biotechnology Information, Accession No. NC 010455, Gen: 208205560-208300127. Autor: Swine Genome Sequencing Consortium, 2011

# Transferrin



Abb. 6e: Übersicht für TF. Grün: Lage der Primer; Blau: Exons, nummeriert; Schwarz: Introns, Abstand zwischen Exons in Basenpaaren; Rot: 3'bzw. 5'UTR, gelbes Dreieck: Lage des SNP; Quelle: National Center for Biotechnology Information, Accession No. NW\_003611713, Gen: 558487-598485. Autor: Swine Genome Sequencing Consortium, 2011

Transferrin-Rezeptor







Abb. 6f: Übersicht für TFRC. Grün: Lage der Primer; Blau: Exons, nummeriert; Schwarz: Introns, Abstand zwischen Exons in Basenpaaren; Rot: 3'bzw. 5'UTR; gelbes Dreieck: Lage des SNP; Quelle: National Center for Biotechnology Information, Accession No. NW\_003611790, Gen: 185135-205927. Autor: Swine Genome Sequencing Consortium, 2011

61

| Gen             | Position | SNP                         | Тур         | Lage     | NCBI | Quelle            |
|-----------------|----------|-----------------------------|-------------|----------|------|-------------------|
| Transferrin     | 4        | E: G/G, S1: A/A, S2: A/A    | homozygot   | 5`UTR    | ja   |                   |
| (TF)            | 2421     | E: T/T, S1: C/C, S2: C/C    | homozygot   | Intron   | ja   |                   |
|                 | 2562     | E: A/A, S1: G/G, S2: G/G    | homozygot   | Intron   | ja   |                   |
|                 | 2734     | E: G/G, S1: A/A, S2:A/A     | homozygot   | Intron   | ja   |                   |
|                 | 9780     | E: T/T, S1: C/C, S2: C/C    | homozygot   | Intron   | ja   |                   |
|                 | 9837     | E: C/C, S1: T/T, S2: T/T    | homozygot   | Intron   | ja   |                   |
|                 | 13709    | n.v.                        |             | Exon     | ja   | NCBI, rs 81478330 |
|                 | 13801    | n.v.                        |             | Exon     | ja   | NCBI, rs 81209058 |
|                 | 13811    | n.v.                        |             | Exon     | ja   | NCBI, rs 81209057 |
|                 | 14681    | E: A/A, S1: G/G, S2: G/G    | homozygot   | Intron   | nein |                   |
|                 | 14743    | n.v.                        |             | Exon     | ja   | Danilowicz (09)   |
|                 | 14821    | n.v.                        |             | Exon     | ja   |                   |
|                 | 19157    | E: T/T, S1: C/C, S2: C/C    | homozygot   | Intron   | nein |                   |
|                 | 20003    | E: G/G, S1: A/A, S2: A/A    | homozygot   | Intron   | ja   |                   |
|                 | 20108    | E: G/G, S1: A/A, S2: A/A    | homozygot   | Intron   | ja   |                   |
|                 | 21646    | E: T/T, S1: C/C, S2: C/C    | homozygot   | Intron   | ja   | Danilowicz (09)   |
|                 | 22067    | n.v.                        |             | Exon     |      | NCBI, rs 81211479 |
|                 | 22108    | n.v.                        |             | Exon     | ja   | Danilowicz (09)   |
|                 | 33028    | n.v.                        |             | Exon     | ja   |                   |
|                 | 33145    | E: C/C, S1: T/T, S2: T/T    | homozygot   | Intron   | ja   |                   |
| Transferrin-    | -603     | E: A/G, S1: G/G, S2: G/G    | heterozygot | Promotor | ja   |                   |
| Rezeptor        | 1574     | n.v.                        | /0          | Exon     | ja   | NCBI, rs 81218929 |
| (TFRC)          | 7189     | E: C/T, S1: T/T, S2: T/T    | heterozygot | Intron   | ja   |                   |
| , ,             | 7406     | E: A/G, S1: G/G, S2: G/G    | heterozygot | Intron   | ja   |                   |
|                 | 9953     | E: C/T, S1: T/T, S2: T/T    | heterozygot | Exon     | ja   |                   |
|                 | 10315    | E: G/T. S1: G/G. S2: G/G    | heterozygot | Intron   | j    |                   |
|                 | 10771    | E: A/G, S1: G/G, S2: G/G    | heterozygot | Exon     | nein |                   |
|                 | 12801    | E: C/T. S1: T/T. S2: T/T    | heterozygot | Intron   | ia   |                   |
|                 | 15042    | E: A/A. S1: A/T. S2: A/T    | heterozygot | Intron   | nein |                   |
|                 | 17764    | E: C/T. S1: C/C. S2: C/C    | heterozygot | Intron   | nein |                   |
|                 | 20441    | E: A/T. S1: T/T. S2: T/T    | heterozygot | Intron   | nein |                   |
| Interleukin 12A | 1271     | E: T/C. S1: C/C. S2: C/C    | heterozygot | Intron   | ia   |                   |
| (IL12A)         | 7183     | E: A/G, S1: G/G, S2: G/G    | heterozygot | 3`UTR    | ja   |                   |
| · · /           | 7249     | E: C/T. S1: T/T. S2: T/T    | heterozygot | 3`UTR    | ia   |                   |
| RUNX1           | 94531    | E: G/G, S1: G/G, S2: A/A    | homozygot   | Intron   | nein |                   |
|                 | 94613    | E: T/T. S1: T/T. S2: C/C    | homozvgot   | Intron   | nein |                   |
| AHSG            | 102      | E: A/G, S1: G/G, S2: G/G    | heterozygot | Intron   | ia   |                   |
|                 | 11086    | E: G/G, S1: C/C, S2: C/C    | homozygot   | Intron   | ia   |                   |
|                 | 11137    | E: G/G, S1: A/A, S2: A/A    | homozygot   | Intron   | ia   |                   |
|                 | 11846    | E: A/A, S1: G/G, S2: G/G    | homozygot   | Intron   | ia   |                   |
| MYD88           | 1671     | E: G/G, S1: G/T, S2: T/T    | heterozygot | Intron   | ia   |                   |
|                 | 1705     | E: C/C, S1: C/A, S2: A/A    | heterozygot | Intron   | j    |                   |
|                 | 2080     | E: A/A. S1: A/T. S2: T/T    | heterozygot | Intron   | ja   |                   |
|                 | 2402     | E: C/C. S1: C/T. S2: T/T    | heterozygot | Intron   | ja   |                   |
|                 | 2409     | E: G/G, S1: G/A. S2: A/A    | heterozygot | Intron   | ia   |                   |
|                 | 2692     | E: T/T, S1: T/T, S2: C/C    | homozveot   | 3`UTR    | ja   |                   |
|                 | 2707     | E: A/A, S1: A/G, S2: G/G    | heterozygot | 3'UTR    | ia   |                   |
|                 | 3026     | E: G/G, S1: A/G, S2: A/A    | heterozygot | 3'UTR    | ia   |                   |
|                 | 3208     | E: A/A, S1: A/A, S2: G/G    | homozygot   | 3'UTR    | ia   |                   |
|                 | 3241     | F: F: A/A, S1: A/T, S2: T/T | heterozygot | 3'UTR    | ja   |                   |
|                 | 3241     | E: C/C, S1: C/T, S2: T/T    | heterozygot | 3'UTR    | ja   |                   |
|                 | 3295     | E: G/G, S1: G/A, S2: G/G    | heterozygot | 3`UTR    | ja   |                   |

**Tab. 4: SNP-Übersicht**. Alle bei der Sequenzierung der Elterntiere gefundenen SNPs sind aufgelistet. SNPs, die in der F2 Population weiter untersucht wurden sind dunkelblau unterlegt. N.v : nicht vorhanden (hier nicht ausgeprägt, betrifft die vorab untersuchten SNPs).

#### 4.2 Kopplungskarte von SSC13

Neun in der untersuchten Tierfamilie informative DNA-Marker bilden das Grundgerüst der genetischen Karte für SSC13 (Abb. 7a). Die Genotypen der F2-Tiere an den jeweiligen Markerpositionen wurden von Reiner et al. (2014) ermittelt. Der Marker IFNAR1 ist der Dissertationsschrift von I. Probst (Probst 2009) entnommen und wurde mittels des Programmes CRI-MAP bei 100 cM lokalisiert.



**Abb. 7a: Lage der verwendeten, informativen Marker auf SSC13.** Links: SSC13, Abstände in 10-cM-Schritten. Gesamtlänge des Chromosoms: 126,2 cM (Rohrer et al. 1996). Rechts: Bezeichnung, Position in cM und Quelle, der die jeweiligen Marker entnommen sind. Gestrichelt: Markerposition auf SSC13



Abb. 7b: Lage der verwendeten, informativen und der neuen Marker (blau unterlegt) auf SSC13. Links: SSC13, Abstände in 10-cM-Schritten. Gesamtlänge des Chromosoms: 126,2 cM (Rohrer et al. 1996). Rechts: Bezeichnung, Position in cM und Quelle, der die jeweiligen Marker entnommen sind. Rot gestrichelt: Lage der SNPs in Kandidatengenen als zusätzliche Marker. Grün gestrichelt: Lage von TFRC und RUNX1, bei denen keine geeigneten SNPs für die QTL-Analyse vorhanden waren. Schwarz gestrichelt: Position der als "Gerüst" verwendeten Marker

#### 4.3 QTL-Analyse

Die QTL Analyse wurde mithilfe der Anwendung GridQTL (Seaton et al. 2006) durchgeführt und zweimal für jedes Kandidatengen wiederholt. Zu Beginn wurden ausschließlich die bereits bekannten Markerinformationen berücksichtigt. In einem zweiten Schritt wurde die QTL-Analyse wiederholt, mit dem Unterschied, dass jeweils ein SNP als zusätzlicher Marker eingesetzt wurde. In einem dritten Schritt ging der SNP als fixer Effekt in die QTL-Analyse ein. Von allen Kandidatengenen wurden SNPs in die QTL-Analyse einbezogen, bis auf SNPs in den Kandidatengenen RUNX1 und TFRC. Da bei beiden SNPs aus RUNX1 die Genotypen des F0-Ebers und Sau 173 identisch waren (Tab. 4) und sich die SNPs im Intron des Gens befanden, ist ein kausaler Zusammenhang mit Resistenzunterschieden gegenüber *Actinobacillus pleuropneumoniae* unwahrscheinlich. Da der SNP aus TFRC aufgrund der ungünstigen Allelverteilung in der F1-Generation bei dem Großteil der F2-Tiere nicht und bei den restlichen 30 F2-Tieren nur halb-informativ war, wurde er ebenfalls nicht in der QTL-Analyse verwendet. Bei der Einbeziehung der SNPs MYD88-1 und MYD88-2 in die QTL-Analyse waren die Ergebnisse in allen Fällen identisch, daher wurden beide SNPs zu einem SNP zusammengefasst und als "SNP MYD88" bezeichnet.

#### 4.4 Ergebnisse der QTL-Analyse

#### 4.4.1 Klinische Merkmale

Von 17 untersuchten klinischen Merkmalen erreichten nur F-Werte von "Klinischer Score gesamt 3dpi" (KSges3d), "Klinischer Score gesamt 4dpi" (KSges4d) und L0H1 (die 50 am wenigsten und 50 am stärksten betroffenen Tiere, gemessen am RHS) den Schwellenwert von 5,7 für die chromosomweite Signifikanz ( $P \le 0,05$ ). Eine QTL-Analyse für die beiden erstgenannten Merkmale ergab je einen QTL bei 62 bzw. 61 cM, in denen die F-Werte den Schwellenwert erreichten, für das Merkmal L0H1 ergab sich ein QTL, bei dem der F-Wert 5,7 überschritten wurde, bei 58 cM.

#### KSges3dpi:

Bei Berücksichtigung des SNPs IL12-1 als zusätzliche Genotyp-Information stieg der F-Wert bei 62 cM an und erreichte knapp den Schwellenwert (5,70). Das Konfidenzintervall sank dabei von 88 auf 83 cM. Bei Einbeziehung des SNPs als fixen Effekt sank der F-Wert auf 0,99 und das Konfidenzintervall stieg auf 102 cM.

#### KSges4dpi:

Auch hier wurde der Schwellenwert bei 61 cM nur durch Einbeziehung des SNPs IL12-1 als Marker überschritten (5,71) und sank bei Betrachtung des SNPs als Effekt deutlich ab (0,67). Das Konfidenzintervall fiel bei Betrachtung des SNPs als Marker von 102 auf 52 cM und ging bei Betrachtung des SNPs als fixen Effekt wieder auf den Ausgangswert zurück.

#### *L0H1*:

Bei 58 cM war bei ausschließlicher Berücksichtigung des Marker-"Gerüsts" ein QTL auf SSC13 erkennbar (F-Wert: 6,46). Als Reaktion auf zusätzliche Information durch die SNPs blieb der F-Wert entweder gleich (AHSG, MYD88, TF) oder sank leicht ab (IL12-1, IL12-2). Bei Einbeziehung des SNPs als Effekt sank der F-Wert kaum (AHSG, MYD88) bis deutlich (IL12-1, IL12-2, TF) ab. Sowohl bei der Betrachtung der SNPs als Marker als auch bei der Einbeziehung der SNPs in die QTL-Analyse als fixe Effekte wichen die Größen der Konfidenzintervalle kaum vom jeweiligen Ausgangswert (102 cM) ab.

#### 4.4.2 Cis-eQTL

Der F-Wert für chromosomweite Signifikanz lag bei 6,4 ( $P \le 0,05$ ). Dieser Schwellenwert wurde bei ausschließlicher Verwendung der Mikrosatelliten als Marker bei drei der fünf betrachteten Cis-eQTL überschritten. Es zeigten sich drei QTL-Regionen bei ca. 20-30 (QTL1), 60 (QTL2) und 100 cM (QTL3) auf SSC13.

#### UPK1B:

Bei QTL1 wurde die F-Signifikanzschwelle bei Einbeziehung des SNP MYD88 deutlich überschritten (F-Wert: 9,20) und das Konfidenzintervall stark verkleinert (von 102 auf 22,5 cM). Wurde der SNP als fixer Effekt betrachtet, sank der F-Wert stark ab (0,52) und das Konfidenzintervall wurde auf den Ausgangswert vergrößert.

#### LOC100132553:

Der Schwellenwert wurde ohne Berücksichtigung der SNPs durch QTL2 (F-Wert: 7,48, CI: 56 cM) überschritten. Nach Einbeziehung der SNPs ließen sich zwei Verhaltensmuster von F-Wert und Konfidenzintervall unterscheiden. Bei Einbeziehung der SNPs AHSG und MYD88 als zusätzliche Marker gab es keine Veränderung des F-Werts und auch das Konfidenzintervall blieb nahezu gleich (56,5 cM bzw. 54 cM).Wurde der SNP als Effekt betrachtet reagierte der F-Wert mit Absenkung (2,19 bzw. 6,06), das CI wurde größer (100 cM

bzw. 99 cM). Ein anderes Verhalten dieser beiden Werte ließ sich bei Betrachtung der SNPs IL12-1, IL12-2 und TF feststellen. Bei Einbeziehung der SNPs als Marker blieb der F-Wert gleich oder zeigte einen geringfügigen Abfall; das CI blieb nahezu gleich. Bei Einbeziehung der SNPs als fixen Effekt stieg der F-Wert leicht (TF: 8,12) bzw. stark (IL12-1 und IL12-2: 24,78) an. Das CI wurde in allen Fällen vergrößert (TF: 96,5 cM, IL12-1: 94 cM, IL12-2: 93,5 cM).

#### RAB6B:

Der Schwellenwert ohne Einbeziehung der SNPs wurde durch QTL1 (F-Wert: 6,64, CI: 102 cM) und QTL2 (F-Wert: 26,89, CI: 18 cM) überschritten. Wurden die SNPs als Marker betrachtet, blieben die F-Werte gleich, wurden die SNPs als Effekt betrachtet, kam es zu einem Absinken der F-Werte (auf ca. 1,2). Das CI war in allen Fällen gleichbleibend (102 cM). Hervorzuheben ist der SNP MYD88, bei dessen Einbeziehung die F-Werte von dem beschriebenen Verhalten abwichen: bei Berücksichtigung dieses SNPs als Marker stieg der F-Wert auf nahezu das 3-fache des Ausgangswertes (17,16) an, während die Betrachtung als fixen Effekt ein starkes Absinken des F-Werte bereits ohne Einbeziehung der SNPs sehr hoch waren. Diese änderten sich kaum, wenn der SNP als Marker in die QTL-Berechnung mit einbezogen wurde. Bei Betrachtung als fixe Effekte sank der F-Wert ab (F-Wert Differenz im Mittel: -22,34) und das CI wurde größer (CI Differenz im Mittel: +82,75). Der SNP MYD88 folgte diesem Verhalten leicht abgeschwächt. Bei Einbeziehung des SNPs TF als Marker konnte eine leichte Erhöhung des F-Werts (von 26,89 auf 27, 62) und eine Verkleinerung des Konfidenzintervalls (von 18 cM auf 15,5 cM) festgestellt werden.

TF:

Der Schwellenwert ohne Einbeziehung von SNPs wurde durch QTL1 (F-Wert: 17,84; CI: 102) und QTL2 (F-Wert: 60,37; CI:12) überschritten. Bei Betrachtung von QTL1 wurde lediglich durch Einbeziehung des SNP MYD88 eine Steigerung des F-Wertes (24,7) hervorgerufen. Wurden die SNPs als fixe Effekte einbezogen, sank der F-Wert ab. Das CI blieb in allen Fällen unverändert. Hinsichtlich QTL2 zeigten alle SNPs unterschiedliche Auswirkungen auf F-Werte und Konfidenzintervalle. Für den SNP AHSG als Marker blieben F-Wert und CI gleich. Bei Einbeziehung von AHSG als fixer Effekt sank der F-Wert ab, das CI wurde vergrößert. Das gleiche Bild zeigte sich bei IL12-1 und IL12-2, mit dem Unterschied, dass die Reaktionen von F-Wert und CI auf die Betrachtung des SNPs als fixen

Effekt ausgeprägter waren. Bei Berücksichtigung des SNP MYD88 blieb der F-Wert gleich, das CI wurde vernachlässigbar vergrößert. Wurde der SNP als fixer Effekt betrachtet, sank der F-Wert deutlich ab (auf 25,8), das CI wurde geringfügig größer (von 12 auf 17 cM). Davon abweichend war die Situation, wenn der SNP im TF-Gen selbst auf Assoziation mit dem eQTL für TF-Expression geprüft wurde. Bezog man den SNP als Marker in die QTL Analyse ein, stieg der F-Wert an (69,45) das CI blieb etwa gleich (11 cM). Die Betrachtung des SNPs als fixer Effekt resultierte in einem starken Abfall des F-Werts (2,46) und einer deutlichen Vergrößerung des CI (102cM).

#### 4.4.3 Δ F-WERTE unter Einbeziehung der SNPs als zusätzliche Marker in die QTL-Analyse

Die Betrachtung der Differenzen aller F-Werte zeigte, dass die Einbeziehung eines SNPs als zusätzlicher Marker bei einem Großteil der Cis-eQTL keinen Einfluss auf die F-Werte nahm (F-Wert-Differenz = 0). Abgesehen davon fielen zwei Ausreißer auf. Die mit 10,53 deutlichste Erhöhung des F-Werts war bei der Berücksichtigung des SNPs MYD88 als zusätzlicher Marker in der QTL-Analyse des QTL1 für RAB6B zu erkennen (Abb.8). Bezog man den SNP TF in die Berechnung des QTL 2 (56 cM) für den Cis-eQTL Transferrin mit ein, betrug der F-Wert-Anstieg 9,08 (Abb. 8). Ebenfalls auffällig war, dass der dem QTL1 (27 cM) von UPK1B zugehörige F-Wert bei Zusatz des SNPs MYD88 als Marker um 3,04 erhöht wurde. Abbildung 4 stellt die mittlere F-Wert-Veränderung bei Einbeziehung aller SNPs als Marker und F-Wert-Differenzen vom Median in einigen Fällen grafisch dar.



**Abb 8:** Δ **F-Werte**: x-Achse: Δ F-Wert bei Einbeziehung des SNPs als zusätzlicher Marker; y-Achse: F-Wert; Sterne markieren Veränderung der F-Werte bei Betrachtung der SNPs als zusätzliche Marker; in Klammern: (SNP/ eQTL); 5% Quantil: -1,5; Median: 0,0; 95% Quantil: 7,3

#### 4.4.4 Δ CI–Werte unter Einbeziehung der SNPs als zusätzliche Marker in die QTL-Analyse

Wurden die ausgewählten SNPs als zusätzliche Marker in die QTL-Berechnung mit einbezogen, veränderte sich das Konfidenzintervall in der überwiegenden Anzahl der Fälle nicht (Abb.9). Erwähnenswert ist, dass bei der Berücksichtigung des SNPs MYD88 als Marker bei der Berechnung des QTL1 (27 cM) von UPK1B das CI um 79,5 cM verkleinert wurde. Wurde IL12-1 als zusätzlichen Marker für den QTL 2 (56 cM) von Transferrin eingesetzt, wurde das CI um 5 cM verkleinert.



**Abb. 9:**  $\Delta$ CI: x-Achse:  $\Delta$  CI bei Einbeziehung der SNPs als zusätzliche Marker; y-Achse: cM. Sterne markieren Veränderung der CI-Werte bei Betrachtung der SNPs als zusätzliche Marker; in Klammern: (SNP/ eOTL): 5% Ouantil: -57.2: Median: 0.0: 95% Ouantil: 12.5

#### 4.4.5 Δ F-WERTE unter Einbeziehung der SNPs in die QTL-Analyse als fixe Effekte

Wurde der SNP als fixer Effekt in die QTL Analyse mit einbezogen sank der F-Wert im Mittel um 3,5 ab (Abb. 10). Als besonders stark abweichend vom Median stellten sich die SNPs TF, Il12-1 und IL12-2 dar, die als Effekt bei Berechnung des QTL 2 (56 cM) für den Cis-eQTL von Transferrin den F-Wert um 57,91 bzw. 59,19 absenkten.



### **Abb. 10:** $\Delta$ **F-Werte (Effekt):** x-Achse: $\Delta$ F-Wert bei Betrachtung der SNPs als fixe Effekte, y-Achse: F-Wert; Sterne markieren Veränderungen der F-Werte bei Betrachtung des SNPs als fixer Effekt; in Klammern: (SNP/e-QTL); 5% Quantil: -59,2; Median: -3,5; 95% Quantil: 17,3

#### 4.4.6 Δ CI-Werte unter Einbeziehung der SNPs in die QTL-Analyse als fixe Effekte

Bei der Betrachtung der SNPs als fixer Effekt wurde das CI im Mittel um 37,5 vergrößert (Abb. 11).



**Abb. 11:**  $\Delta$  CI (Effekt); x-Achse:  $\Delta$  CI bei Betrachtung der SNPs als fixe Effekte; y-Achse: cM; Sterne markieren Veränderungen der CI-Werte bei Betrachtung des SNPs als fixer Effekt; 5% Quantil: -23,4; Median: 37,5; 95% Quantil: 90

#### 5. Diskussion

#### 5.1 Kritische Betrachtung des Materials und der Methoden

#### 5.1.1 Versuchstiere und F2-Ansatz

Grundlage für die molekulargenetischen Untersuchungen zur Actinobacillus Als pleuropneumoniae-Resistenz dient eine F2-Familie, die aus der Kreuzung zweier in diesem Merkmal divergierender Ausgangpopulationen der Rassen Hampshire und DL resultierten. Das F2-Design wird gemeinhin neben dem Backcross-Design (BC) als geeignet angesehen, um QTL für ein bestimmtes Merkmal zu identifizieren (Geldermann 2005, Andersson 2001). Laut Darvasi (1998) ist das F2-Design dem BC-Design überlegen, wenn möglichst viele segregierende QTL und deren additive und dominante Effekte ermittelt werden sollen. Es existieren zahlreiche Studien, die für die Eignung des F2-Ansatzes für die Kartierung von Produktionsmerkmalen (z.B. Andersson et al. 1994; De Koning et al. 1999; Ai et al. 2012) oder Immunmerkmalen (z.B. Reiner et al. 2007a, 2010; Uddin et al. 2011) beim Schwein sprechen. Eine Studie von Python et al. (2002) belegt am Beispiel des E. coli-F4ac-Rezeptors, dass das F2-Design auch gut zur Feinkartierung von QTL genutzt werden kann, wobei hier zu beachten ist, dass dem betrachteten Merkmal wahrscheinlich ein einzelnes Gen mit Mendel'schem Vererbungsmodus zugrundeliegt (Sellwood et al. 1975). Um eine geeignete F2-Familie generieren zu können, wurden Ausgangspopulationen, die sich im Merkmal Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz unterscheiden, benötigt (Geldermann 2005). Mehrere Studien belegen, dass Populationen innerhalb der Rassen Hampshire und DL eine solche günstige Paarungskonstellation darstellen. Beispielsweise zeigte die Klassifizierung verschiedener Rassen hinsichtlich Resistenz/Empfänglichkeit gegenüber Actinobacillus pleuropneumoniae mithilfe des Respiratory Health Score (RHS) deutliche Unterschiede sowohl in der Schwere der klinischen Symptome als auch in der Mortalität zwischen infizierten Schweinen der Rassen Hampshire und DL (Höltig et al, 2009). Eine Proteomanalyse nach experimenteller Actinobacillus pleuropneumoniae-Infektion anhand von BALF-Probenmaterial durch Kahlisch et al. bestätigte, dass (2009)deutliche Rassenunterschiede bezüglich der Schwere der Lungenveränderungen existieren und wies auf rasseabhängige, differentielle Expression der untersuchten Glykoproteine hin. Die These, dass die Variation im Merkmal Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz von unterschiedlichen rassespezifischen und individuellen Immun-Phänotypen beeinflusst wird, wurde durch eine Analyse des Verhaltens von Akute Phase Proteinen und Produkten des Respiratory Burst nach

*Actinobacillus pleuropneumoniae*-Infektion von Benga et al. (2009) unterstützt. Da die genannten Studien nur Teilpopulationen der beiden Founderrassen untersucht haben, kann davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Effekte zwar innerhalb dieser Populationen gelten, jedoch nicht zwangsläufig auf die gesamte Rasse übertragen werden können. Dies zeigte sich zum Beispiel darin, dass bei der Deutschen Landrasse neben der empfindlichen auch eine resistente Teilpopulation identifiziert werden konnte. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Stichprobenanzahl von 170 untersuchten F2- Tieren ist nach der Power-Analyse von Cohen (1988) optimal, um einen mittleren Effekt und mit guter Wahrscheinlichkeit auch einen Kleinen Effekt finden zu können.

#### 5.1.2 Auswahl von SSC13 als zu untersuchendes Chromosom

Die Suche nach Kandidatengenen für die *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Resistenz beim Schwein konzentriert sich in dieser Arbeit auf SSC13, da auf diesem wiederholt QTL, die mit pathologischen oder klinischen Merkmalen assoziiert sind, kartiert wurden. In einer Studie von Gregersen et al. (2010) die an einer großen Anzahl von Tieren der Kreuzung Duroc x LR/LW durchgeführt wurde, wurde u.a. ein mit dorso-caudaler Pleuritis assoziierter QTL auf SSC13 festgestellt. In der bereits erwähnten Untersuchung von Reiner et al. (2014) wurde ein QTL für eine extreme Gruppierung der 100 nach dem *Respiratory Health Score (RHS)* am stärksten und am wenigsten stark betroffenen Tiere auf SSC13 bei 56 cM kartiert. Auch die Ergebnisse einer eQTL-Analyse von Reiner et al. (unveröffentlicht) mit der Kartierung von 55 (von insgesamt 193) gefundenen eQTL für potentiell mit *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mit der vorliegenden Arbeit konnten ein QTL für den Respiratory Health Score der 50 am wenigsten und 50 am stärksten betroffenen Tiere sowie mehrere Cis-eQTL für die Resistenz gegen *Actinobacillus pleuropneumoniae* bestätigt werden.

#### 5.1.3 Auswahl der Kandidatengene

Im Bewusstsein, dass eine erschöpfende Auswahl bzw. Untersuchung aller möglichen Kandidatengene, die mit Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz in Zusammenhang

stehen könnten unmöglich ist, wurden folgende Kriterien bestimmt, um die nach aktuellem Wissenstand bestmögliche Auswahl zu treffen:

a. Forschungsergebnisse, die zu dem jeweiligen Gen hinsichtlich Krankheitsresistenz und/oder *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Resistenz vorliegen;

b. Funktion des Gens im Stoffwechsel;

c. Position des Gens auf SSC13

#### Ad a. Forschung

Zu allen untersuchten Kandidatengenen liegen Ergebnisse vor, die es wahrscheinlich erscheinen lassen, dass diese die phänotypische Variation bei einer Actinobacillus pleuropneumoniae-Infektion beeinflussen können. Hohe Level von a-2-HS-Glykoprotein (AHSG) waren beispielsweise negativ korreliert mit dem Auftreten von Actinobacillus pleuropneumoniae-assoziierten Lungenläsionen bei Hampshire-Schweinen (Kahlisch et al. 2009). Für IL12A weisen die Ergebnisse einer Assoziationsstudie auf eine wichtige Rolle dieses Gens in der Immunabwehr im Allgemeinen hin (Wimmers et al. 2008). Die starke Kolokalisation der IL12-mRNA mit Actinobacillus pleuropneumoniae-assoziierten Lungenveränderungen in einer Hybridisierungsstudie deutet auf einen speziellen Einfluss des IL12-Gens im Rahmen der Pathogenese der Actinobacillus pleuropnaumoniae-Infektion hin (Cho et al. 2005). MYD88 wurde im Zuge einer Netzwerkanalyse von Reiner et al. (unveröffentlicht) als ein die Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz beeinflussendes Gen identifiziert. Durch die gleiche Forschergruppe wurde RUNX1 mithilfe einer Promoter-Sequenz-Analyse als ein während der Infektion differentiell exprimierter Transkriptionsfaktor detektiert. Transferrin wurde bereits von Danilowicz et al. (2009) als Kandidatengen für Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz beim Schwein untersucht. In dieser Studie wurde eine Assoziation von SNPs im TF-Gen mit der klinischen Schwere der Infektion bei Tieren der Deutschen Landrasse festgestellt. Da TFRC einen essentiellen Interaktionspartner für TF darstellt, kann es gleichermaßen als Kandidatengen angesehen werden.

#### Ad b. Funktion

Bei der Einbeziehung der physiologischen Funktion des Gens als Auswahlkriterium wurde auf eine möglichst zentrale Rolle insbesondere in der angeborenen Immunantwort geachtet, weil die wesentlichen Resistenz-bestimmenden Schritte bis zum Tag 4 bereits abgeschlossen scheinen (Höltig et al. 2009). AHSG, IL12A, MYD88, TF und TFRC nehmen entweder durch ihre Rolle in der Zytokinantwort, im TLR-Pathway oder bei der Eisenakquisition der Mikroorganismen eine zentrale Rolle in der First Line of Defense ein, wohingegen RUNX1 seine Wirkung in der adaptiven Immunantwort entfaltet.

#### Ad c. Position

Hinweise auf die Bedeutung von SSC13 für die Abwehr von *Actinobacillus pleuropneumoniae* ergeben sich aus den Arbeiten von Reiner et al. (2014) und Gregersen et al. (2010). Hierbei wurde ein QTL für die extreme Gruppierung von Tieren bei Einstufung durch den *Respiratory Health Score* bei 56 cM identifiziert (Reiner et al. 2014). Ein QTL für das Merkmal "dorsocaudale Pleuritis" wurde bei 3 cM detektiert (Gregersen et al. 2010). Zusätzlich wurden durch Reiner et al. (unveröffentlicht) je ein Cis- eQTL für TF und TFRC auf SSC13 identifiziert. TF, IL12A, AHSG und TFRC gelten aufgrund ihrer Lage als positionelle Kandidatengene für den QTL bei 56 cM. Die identifizierten Cis-eQTL deuten zusätzlich darauf hin, dass sich im Transferrin-Gen und im Transferrin-Rezeptor-Gen kausative Polymorphismen befinden, die die *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Resistenz beeinflussen.

#### 5.1.4 Auswahl der SNPs

Da nicht alle aufgefundenen SNPs untersucht werden konnten, wurde für die Auswahl der näher zu untersuchenden SNPs ein ähnliches Prinzip angewendet wie für die Auswahl der Kandidatengene, ein Ansatz, der von Tabor et al. (2002) als "Priorisierungs-Strategie" bezeichnet wurde. Dabei werden aufgefundene Polymorphismen nach der Wahrscheinlichkeit, mit der sie einen funktionalen Effekt auf das Gen haben könnten kategorisiert, und die Polymorphismen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (z.B. Aminosäure-Austausch in der ersten Position in der kodierenden Sequenz) bevorzugt berücksichtigt (Tabor et al. 2002). Die Annahme, dass SNPs in kodierenden Regionen mit höherer Wahrscheinlichkeit einen bestimmten Phänotyp beeinflussen, wird in der Humanmedizin für Kalkulationen über den Einfluss von SNPs genutzt. Hierbei soll das Ausmaß, in dem SNPs mit Aminosäure-Austausch die Genfunktion beeinflussen, ermittelt werden (Sunyaev et al. 2001; Chasman und Adams 2001; Ng und Henikoff 2002). Zu diesem Zweck stellten Barenboim und Manke (2013) mit ChroMoS ein Programm zur Einschätzung von SNPs hinsichtlich ihres Einflusses auf transkriptionelle und posttranskriptionelle Prozesse vor. Weitere Beispiele für das Vorgehen zur Auswahl an SNPs gestaffelt nach Priorität liefern Studien von Wang et al. (2007) und Danilowicz et al. (2009). Es ist unbestritten, dass auch SNPs in nicht-kodierenden Regionen Einfluss auf die Genfunktion nehmen können (Tabor et al. 2002; Van Laere et al. 2003). Da aber nicht alle SNPs untersucht werden können, ermöglicht es der beschriebene Ansatz aus der Menge verfügbarer SNPs die vielversprechendsten auszuwählen.

#### 5.1.5 QTL-Analyse

Die QTL-Analyse ist ein Verfahren, dass zur Detektion von genetischer Variation, die Unterschieden in phänotypischen Merkmalen zugrundeliegt, geeignet ist (Andersson 2001; Mackay 2001; Mauricio 2001). Sie wird daher auch zur Aufklärung der genetischen Basis der Krankheitsresistenz eingesetzt. Trotz der Möglichkeiten, die dieses Verfahren bietet, bringt es auch eine Reihe von Einschränkungen mit sich. Diesen muss bei Versuchsaufbau und Auswertung Rechnung getragen werden, um ein verlässliches Ergebnis zu erhalten. Im Folgenden sollen daher einige Hemmnisse der QTL-Analyse aufgezeigt und deren Bedeutung für die vorliegende Arbeit diskutiert werden.

a. "Bei den meisten phänotypischen Merkmalen ist ein großer Teil der Variation umweltbedingt" (Kearsey 1998).

Laut Slate (2005) spielt die umweltbedingte Variation vor allem bei Merkmalen, die die Fitness beeinflussen, eine große Rolle. Da eine Standardisierung des Ansatzes auch eine Reduktion der Versuchstieranzahl erlaubt, war es für unser Vorhaben besonders wichtig, den Anteil umweltbedingter Variation an der gesamten phänotypischen Variation zu minimieren. Dies erfolgte im Zuge des Versuchsaufbaus. Wolf (2005) nennt in einer Publikation im Rahmen des FUGATO-Projekts die wesentlichen Punkte. Diese umfassen eine möglichst gut definierte Tierfamilie die für die spezielle Fragestellung konzipiert wurde und exakt definierte Umweltbedingungen. Diesen Bedingungen wurde bei dem hier verwendeten Versuchsaufbau Rechnung getragen. Somit ist davon auszugehen, dass die Variation in den ermittelten Phänotypwerten eng mit den zugrundeliegenden genetischen Unterschieden korreliert ist und störende Umweltvariation auf ein Minimum beschränkt wurde.

b. "Die Funktion der die QTN beherbergenden Gene oder ihre Zugehörigkeit zu bestimmten Stoffwechselwegen ist häufig noch nicht bekannt, daher sind sie schwer mit einem QTL in Zusammenhang zu bringen" (Hu et al. 2009).

Dieser Fakt stellt gleichzeitig eine der Haupteinschränkungen für die Anwendung des Kandidatengenansatzes zur QTL-Kartierung dar. Bellamy (2000) sowie Stratil und Geldermann (2004) propagieren daher die Kombination eines genomweiten QTL-Scans mit der Kandidatengenanalyse, um die Detektionswahrscheinlichkeit auch für QTL mit moderatem Effekt zu verbessern. Analog dazu lagen für diese Doktorarbeit Daten aus einer vorangegangen, genomweiten Suche nach QTL (Reiner et al. 2014) vor. In diesem anonymen Ansatz wurden in der vorliegenden Studie hypothesenbasiert zusätzliche Marker in ausgewählten Genen eingefügt, um die interessierende QTL-Region näher einzugrenzen (Tabor et al. 2002). Für deren Auswahl wurden sowohl Position als auch Funktion (s.o.) berücksichtigt. Laut Zhu und Zhao (2007) ist dies ein geeignetes Mittel um den "Flaschenhals der Information" des Kandidatengenansatzes zu umgehen. Stratil und Geldermann (2003) konstatieren, dass Untersuchungen über Kandidatengene für die weitere Forschung von großer Wichtigkeit sind. Nur so kann die Anzahl bekannter Gene erhöht und Informationen über DNA-Polymorphismen, genomische Organisation und Stoffwechselwege vervollständigt werden. Die vorliegende Doktorarbeit zeigt allerdings, dass die Limitierungen des Kandidatengenansatzes auch durch ein großes Maß an vorliegender Information nicht so eliminiert werden können, dass ein Schluss auf ein QTN möglich ist. Vorschläge zu seiner Verbesserung finden sich beispielsweise bei Wayne und McIntyre (2002). Diese Autoren konnten mithilfe einer Kombination aus Feinkartierung and Microarraying die Anzahl vielversprechender Kandidatengene von ursprünglich 5286 auf 34 reduzieren. Auch der computergestützten Analyse von Gennetzwerken und Pathways wird bei der Identifikation

von Kandidatengenen und QTN große Bedeutung beigemessen. Ein Beispiel hierfür ist der Candidate Gene Set Approach, in den die genetischen Informationen multipler Loci einfließen. Hierbei können Kandidatengene mit einer höheren statistischen Power als bei traditioneller QTL-Analyse entdeckt werden (Wang et al. 2013). Eine Zusammenfassung über verschiedene Verfahren des Kandidatengenansatzes (positionell, funktionell, komparativ und digital gestützt) und wie diese miteinander kombiniert werden können, findet sich bei Zhu und Zhao (2007).

c. "Die Auflösung der QTL-Analyse ist meist nicht ausreichend zur Unterscheidung multipler QTL" (Tanksley 1993).

In der Regel wird bei der QTL-Analyse die Lokalisation des QTL nicht genauer als auf ca.10-40 cM bestimmt. Durch diese geringe Auflösung können hunderte Gene als Kandidatengene in Frage kommen (Luo et al. 2002; Georges 2007). Darvasi et al. (1993) konnten in einer Simulationsstudie zeigen, dass hierbei die Abstände der verwendeten Marker nur eine untergeordnete Rolle im Vergleich zu Geneffekt und Populationsgröße haben. Luo et al. (2002) und Georges (2007) nennen zusätzlich eine zu geringe Anzahl an informativen Meiosen als Hemmnis, das der Ermittlung der genauen QTL-Position entgegensteht. Die Methodik der hier vorliegenden Doktorarbeit könnte daher an zwei Punkten verbessert werden, die allerdings mit einem erheblichen logistischen Mehraufwand und Kosten verbunden wären: Erstens könnte die zu untersuchende Tierpopulation vergrößert werden, was zusätzlich zur besseren QTL-Auflösung eine Verringerung des Beavis-Effekts auf den vermuteten QTL-Effekt hätte (Xu 2003). Zweitens könnte man die F2-Familie durch fortgesetzte Rückkreuzung im Sinne einer Advanced Intercross Line (AIL) ausbauen. Durch die Erhöhung der Anzahl informativer Meiosen wäre eine Verkleinerung des Konfidenzintervalls um das 3-5 fache möglich (Darvasi und Soller 1994). Die Züchtung von AILs beim Schwein ist machbar (z.B.: Geverink et al. 2006), jedoch ist deren Generierung und Unterhalt äußerst kostenintensiv (Andersson 2001). Infolgedessen stellen AILs keine praktikable Methode zur Verbesserung der QTL-Analyse bei dieser Tierart dar.

d. "Die Ergebnisse einer QTL-Analyse in einer bestimmten Tierfamilie können nicht direkt auf andere Populationen übertragen werden" (Würschum 2012).

Zu beachten ist, dass QTL nur entdeckt werden können, wenn Allele mit signifikanten Effekten auf das phänotypische Merkmal in der untersuchten Familie segregieren. So kann ein QTL in einer bestimmten Familie unentdeckt bleiben, populationsweit jedoch eine wichtige Rolle spielen (Remington und Purugganan 2003). Gregersen et al. (2010) untersuchten insgesamt 12 Tierfamilien auf QTL für dorsocaudale Pleuritis. Dabei wurden 11 in einer oder mehreren Familien segregierende QTL detektiert, jedoch nur ein QTL, der in allen Familien auffindbar war. Dies bedeutet, dass QTL-Studien in mehreren unterschiedlichen Versuchstierpopulationen wiederholt werden müssen, um die Ergebnisse zu validieren. Oberstes Ziel sollte hierbei die Identifikation eines merkmalsbeeinflussenden Polymorphismus auf DNA-Ebene sein.

#### 5.2 Klinische Merkmale:

#### 5.2.1 Respiratory Health Score der 50 am wenigsten und 50 am stärksten betroffenen Tiere

Bei der QTL-Analyse auf Basis der Mikrosatelliten der Vorversuche wurde nur ein QTL für das Merkmal L0H1 (*Respiratory Health Score* der 50 am wenigsten und 50 am stärksten betroffenen Tiere) gefunden. Wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten SNPs als zusätzliche Marker für die QTL Analyse einbezogen, blieben die F-Werte konstant oder sanken leicht ab. Nach Betrachtung der SNPs als fixe Effekte sank der F-Wert in allen Fällen ab. Das Konfidenzintervall veränderte sich nur minimal. Grundsätzlich kann man durch eine QTL-Analyse, ausgehend von genotypischen und phänotypischen Daten der untersuchten Tiere, die Wahrscheinlichkeit für einen QTL an einer bestimmten Lokalisation im Genom ermitteln. In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein lineares Regressionsmodell für die QTL-Analyse herangezogen. Durch die Berücksichtigung eines zusätzlichen Markers wird die zur Verfügung gestellte genotypische Information erhöht. Bleibt nachfolgend der F-Wert, ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass sich an der betrachteten Position ein QTL befindet (Li et al. 2012) gleich, bedeutet das, dass die Genotypen des neu einbezogenen SNPs nicht enger mit der Variation im klinischen Phänotyp korreliert sind, als die Genotypen der bereits vorher eingesetzten Marker. Das Konfidenzintervall, ein Maß für die Präzision, mit der durch

die Teststatistik die wahre Lage des Populationsparameters (hier: des QTL) geschätzt werden kann (Rasch et al. 2010), wird dementsprechend nicht nennenswert verkleinert. Es kann daher keine genauere Aussage über die Lokalisation des QTL getroffen werden. Dass der SNP dennoch mit dem Phänotyp assoziiert ist, lässt sich daran erkennen, dass bei Betrachtung des SNPs als fixen Effekt im QTL Modell, bei der die durch den SNP erklärbare Varianz in der Phänotyp-Ausprägung aus der QTL-Analyse rechnerisch entfernt wird, der F-Wert absinkt.

#### 5.2.2 Klinischer Score

Im Falle der Merkmale Klinischer Score gesamt 3 dpi und Klinischer Score gesamt 4 dpi nimmt die über den QTL verfügbare Information durch Einbeziehung der SNPs als zusätzliche Marker zu und die Lage des QTL wird näher bestimmt. Im Umkehrschluss zu den bezüglich des Respiratory Health Score der 50 am wenigsten und 50 am stärksten betroffenen Tiere getroffenen Aussagen kann man in diesem Fall davon ausgehen, dass die für diesen SNP ermittelten Genotypen der F2-Tiere stärker als die der bisher eingesetzten Marker mit der Verteilung der Phänotypen korrelieren. Folglich hat man sich an der Lokalisation des SNPs der Position eines putativen QTN angenähert. Im Zusammenhang damit resultieren eine Verkleinerung des Konfidenzintervalls und bei Entfernung der durch den SNP erklärten Varianz aus dem Modell eine Absenkung der F-Werte.

#### 5.2.3 Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeiten

Dass bei der QTL-Analyse mit den bekannten Markern bei allen untersuchten klinischen Phänotypen nur ein einziger QTL auf SSC13 zu erwarten ist, der die chromosomweite Signifikanzschwelle überschreitet, legen Ergebnisse der durch Reiner et al. (2014) an der gleichen Tierpopulation durchgeführten QTL-Studie nahe. Auch diese Gruppe stellte auf SSC13 einen QTL für das Merkmal Respiratory Health Score der 50 am wenigsten und 50 am stärksten betroffenen Tiere bei 56 cM fest. Gregersen et al. (2010) dagegen fanden für das Merkmal "dorsocaudale Pleuritis" einen QTL auf SSC13 bei 3 cM. Die Diskrepanz der ermittelten QTL-Lokalisationen lässt sich durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren erklären: Erstens wurden unterschiedliche Phänotypen untersucht. Der Respiratory Health Score berücksichtigt neben sonografischen und radiologischen auch klinische Befunde (Höltig et al. 2009) und ist daher nicht unmittelbar mit einem ausschließlich auf Ergebnissen einer post-mortem Untersuchung beruhenden Phänotyp vergleichbar. Zweitens wurden Tiere unterschiedlicher Rassen untersucht. Studien weisen auf rassen- und familienspezifische Unterschiede im Auftreten von QTL für den gleichen untersuchten Phänotyp hin (Kim et al. 2005; Gregersen et al. 2010; McClure et al. 2012; Gregersen et al. 2012). Drittens wurde durch den Versuchsaufbau der hier vorliegenden Arbeit eine Infektion mit anderen Pneumonie-verursachenden Pathogenen (*Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV, Influenza A) ausgeschlossen. Das in der Studie von Gregersen et al. (2010) einer vorangegangenen *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Infektion zugeordnete Merkmal dorsocaudale Pleuritis konnte von Jirawattanapong et al. (2010) nicht exklusiv mit diesem Pathogen in Verbindung gebracht werden, so dass auch eine Mischinfektion mit anderen Keimen als Ursache dieses Befundes nicht ausgeschlossen werden kann.

#### 5.2.4 Verhalten des QTL im Bereich des Transferrin-Gens

Eine von Reiner et al. (unveröffentlicht) durchgeführte eQTL-Analyse deutet auf eine große Ansammlung von Genen auf SSC13 hin, die die Expression von anderen Genen mit Einfluss auf die Resistenz /Empfindlichkeit gegenüber Actinobacillus pleuropneumoniae beeinflussen. Dies konnte durch die hier vorliegende Arbeit bestätigt werden. Weiterhin wurde im Bereich des Transferrin-Gens ein Cis-eQTL festgestellt, der einen großen Anteil der Varianz an der Transferrin-Expression zwischen resistenten und empfindlichen Tieren erklärt. Es stellt sich die Frage, warum der verwendete Transferrin-SNP die Auflösung der klinischen QTL nicht verbessert. Obwohl das Transferrin-Expressionslevel mit unterschiedlicher Resistenz/Empfindlichkeit der betrachteten Tiere assoziiert war und hierfür, aufgrund des Cis-Charakters des eQTL, ein putatives QTN in der Nähe des Transferrin-Gens verantwortlich gemacht wurde, scheinen dessen Variationen keine Auswirkung auf die Klinik zu haben. Eine sinnvolle Begründung hierfür ist, dass es sich bei den betrachteten klinischen Phänotypen um quantitative Merkmale handelt, deren Ausprägung per definitionem von teilweise sehr vielen Genen beeinflusst wird (Geldermann 1975). Es ist daher anzunehmen, dass falls diese DNA-Variation im Transferrin-Gen eine Rolle für die Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz spielen sollte, deren Einfluss sehr gering und mit dem hier verwendeten Verfahren daher auch kein QTL auffindbar ist. In der hier vorliegenden Untersuchung konnte keine signifikante Assoziation zwischen dem Transferrin-Gen und klinischen Phänotypen einer Actinobacillus *pleuropneumoniae*-Infektion festgestellt werden. Eine Studie von Danilowicz et al. (2009), die die Assoziation von SNPs im Transferrin-Gen mit Resistenz gegenüber *Actinobacillus pleuropneumoniae* untersuchte, fand einen solchen signifikanten Zusammenhang nur für Tiere der Deutschen Landrasse und stellte rassespezifische Allelfrequenzen fest. Folgerichtig muss ein Einfluss von Varianten des Transferrin-Gens auf die Krankheitsresistenz in Tierpopulationen von züchterischem Interesse zumindest rassespezifisch validiert werden.

#### 5.3 Cis-eQTL

Für SSC13 zeigen sich bei der QTL-Analyse drei Regionen, die mit der Ausprägung der als Merkmal betrachteten Expression von durch Cis-eQTL regulierten Genen assoziiert sind. Eine signifikante Veränderung der statistischen Parameter bei Betrachtung bereits bekannter Marker (SNP0-Effekt0) oder bei der Einbeziehung des SNPs als zusätzlicher Marker (SNP1-Effekt0) ist an mindestens einer der drei QTL-Regionen für alle Cis-eQTL außer TFRC gegeben. Für den SNP TFRC wäre, da er sich im Transferrin-Rezeptor-Gen direkt befindet, aufgrund des Cis-Status des eQTL eine signifikante Assoziation mit der Merkmalsausprägung zu erwarten. Dieser SNP konnte jedoch nicht für eine QTL-Analyse genutzt werden, da er in einer zu geringen Anzahl F2-Tiere informativ war. Theoretisch wäre ein Einfluss der anderen untersuchten SNPs auf den Cis-eQTL der TFRC-Expression zwar möglich, dies ist aber anhand der hier vorliegenden Ergebnisse als unwahrscheinlich anzusehen. Hinsichtlich des Cis-eQTL der Genexpression von LOC100132553 liefert keiner der neu in die QTL-Analyse eingefügten SNPs mehr Information über die Lage eines möglichen kausalen Polymorphismus als die bereits in Modell SNP0-Effekt0 eingesetzten Marker. Vielmehr steigt der F-Wert bei Betrachtung der SNPs IL12-1 und IL12-2 als fixe Effekte deutlich an, dies spricht gegen eine Assoziation dieser beiden SNPs mit dem gefundenen QTL. Wählte man SNPs in Genen, die mit LOC100132553 Stoffwechselwege- oder Gennetzwerke teilen, würde wahrscheinlich eine Assoziation mit der Merkmalsausprägung festzustellen sein. Da die Funktion dieses Locus bisher nicht bekannt ist, ist eine solche Auswahl nicht möglich.

#### 5.3.1 Einfluss des SNPs in MYD88 auf die UPK1B-Expression

Das Verhalten der Parameter F-Wert und Konfidenzintervall bei Berücksichtigung des SNPs MYD88 bei der Betrachtung des Cis-eQTL der UPK1B-Expression deutet darauf hin, dass der verwendete MYD88-SNP mit der differentiellen Expression des Gens Uroplakin 1B assoziiert ist. Während ein direkter Zusammenhang zwischen den Genen UPK1B und MYD88 nicht nachweisbar ist, ergeben sich aus der Literatur Hinweise auf eine funktionelle Verknüpfung der Gene untereinander. Dass die UPK1B-Expression durch das Zytokin TGFß reguliert wird, wurde erstmals von Kallin et al. (1991) festgestellt. TLR-Agonisten wiederum induzieren auf MYD88-abhängigem Weg die TGFβ-Produktion (Chow et al. 2005). Diese Verknüpfung zwischen TGFβ-Signalweg und TLR-MYD88-NFκB Achse wurde durch Seki et al. (2007) bestätigt. Beisswenger et al. (2009) stellten außerdem fest, dass im Zuge der Abwehr von Bakterien durch respiratorische Epithelzellen die Entdeckung der Pathogene via TLR unbedingt notwendig für die nachgeschaltete TGFβ-Signalkaskade ist. Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass MYD88 und die UPK1B-Expression via TGFß in Verbindung stehen und liefern eine mögliche Erklärung für das hier gefundene Ergebnis. Zu beachten ist jedoch im Falle des QTL für UPK1B, dass dieses Gen und MYD88 relativ nah beieinander liegen (bei 27 cM bzw. 31 cM). So ist es nicht auszuschließen, dass die Änderung der statistischen Parameter im Vergleich zu SNP0-Effekt0 vorwiegend aus einer stärkeren Kopplung des SNPs mit dem dem QTL zugrundeliegenden Polymorphismus resultiert, da man sich durch die Einbeziehung des MYD88-SNP dem putativen QTN räumlich angenähert hat.

#### 5.3.2 Einfluss des SNPs in MYD88 auf die RAB6B-Expression

Die Reaktion der statistischen Parameter auf die Berücksichtigung des MYD88-SNP in der QTL Analyse für den Cis-eQTL RAB6B weist darauf hin, dass der verwendete SNP mit der Ausprägung dieses Phänotyps assoziiert ist. Die mittels der QTL-Analyse kalkulierte Wahrscheinlichkeit, dass sich an der betrachteten Stelle ein QTL für RAB6B-Expression während einer APP-Infektion befindet, hat sich deutlich erhöht. Außer der Erkenntnis, dass MYD88 eine wichtige Rolle bei der Ras-induzierten Kanzerogenese bei der Maus spielt (Coste et al. 2010), finden sich in der Literatur keine Hinweise über einen möglichen Zusammenhang zwischen beiden Genen. Dieser kann jedoch keineswegs ausgeschlossen werden, insbesondere wenn man berücksichtigt, dass das RAB6B-Gen erst vor einigen Jahren identifiziert wurde (Opdam et al. 2000) und es sich bei den Rab-GTPasen um eine große Familie von Transportproteinen handelt, deren Funktionen mannigfaltig und daher noch nicht vollständig charakterisiert sind (Schwartz et al. 2007).

#### 5.3.3 Einfluss weiterer SNPs auf die Expression der Cis-regulierten Gene

Betrachtet man die Änderungen der F-Werte und der Konfidenzintervalle bei Einbeziehung der beiden IL12-SNPs in die QTL-Analyse für die RAB6B-Expression, fällt auf, dass diese, obwohl sich die SNPs in enger Nachbarschaft befinden, gegenläufig sind. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, dass zwischen beiden SNPs in einem Teil der F2- Tiere ein Crossing Over während der Meiose stattgefunden hat, was eine unterschiedlich enge Korrelation der SNP-Genotypen an beiden Lokalisationen mit dem betrachteten Phänotyp zur Folge hätte. Auch ist der untersuchte SNP im Transferrin-Gen stärker mit der RAB6B-Expression assoziiert als die vorher verwendeten Marker. Benyamin et al. (2009) fanden mithilfe einer genomweiten Assoziationsstudie heraus, dass ein SNP im RAB6B-Gen des Menschen mit dem Serum-Transferrin-Level assoziiert ist und daher Risiko-Allele für die Entstehung der hereditären Hämochromatose bergen kann. Dies lässt die Vermutung zu, dass beide Gene über unterschiedliche Funktionen im Eisenstoffwechsel miteinander verbunden sind. Jedoch ist es auch hier, aufgrund der Nachbarschaft der Gene möglich, dass die gefundene Assoziation auf der engen Kopplung beider Gene beruht. Eine gesonderte Stellung nimmt der Cis-eQTL für die Transferrin-Expression ein, da bei diesem als einzigem ein SNP aus demselben Gen als zusätzlicher Marker in der QTL-Analyse untersucht wurde. Die Hypothese ging von einer deutlichen Abweichung des Verhaltens der statistischen Parameter bei dieser Konstellation im Vergleich zu allen anderen Konstellationen aus, bei denen die SNPs aufgrund ihrer Lage außerhalb der Cis-eQTL zwangsläufig weniger stark mit dem untersuchten Phänotyp assoziiert sein sollten. Dies konnte durch die erhobenen Daten allerdings nicht bestätigt werden. In der QTL-Analyse nach dem Schema SNP0-Effekt0 ergibt sich ein ausgesprochen hoher F-Wert. Dies spricht mit großer Wahrscheinlichkeit für die Existenz eines QTL für die Transferrin-Expression in der Nähe des Markers Sw 882, da sich ein großer Anteil der phänotypischen Varianz durch die Verteilung der Genotypen am mit dem putativen QTN gekoppelten Marker-Genort erklären lässt. Bei der Durchführung der QTL-Analyse nach den weiteren Schemata unterscheidet sich das Verhalten des F-Wertes und des Konfidenzintervalles bei Berücksichtigung des SNP im Transferrin-Gen nur in einem Punkt von den IL12-1- und IL12-2-SNPs: Der F-Wert steigt bei Betrachtung des TF-SNP als Marker an. Die dort für die F2-Generation vorliegenden Genotypen korrelieren also stärker mit der Verteilung der Phänotypen bei diesen Tieren, als die der anderen SNPs. Da der TF-SNP im untersuchten Gen selbst liegt und sich damit in unmittelbarer räumlicher Nähe zu dem erwarteten QTN befinden muss, entspricht das beobachtete Verhalten der statistischen Parameter den Erwartungen. Zu beachten ist, dass das Konfidenzintervall nur unwesentlich verkleinert wurde und damit die Lage des QTL auf diesem Weg nicht präzisiert werden konnte.

#### 5.4 Schlussfolgerungen

- Zusammenhänge zwischen Genombereichen und phänotypischen Merkmalen können mithilfe des hier verwendeten Schemas zur QTL-Analyse hergeleitet werden (siehe MYD88 /RAB6B; MYD88/UPK1B; TF/ RAB6B).
- Es war mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau zwar möglich, einige QTL-Lokalisationen zu verfeinern, jedoch nicht in dem Maße, um auf ein QTN schließen zu können.

Weitere Studien müssen zeigen, ob sich diese Erkenntnisse auch auf andere Versuchstierpopulationen und Kandidatengene ausweiten lassen. Sollte sich dies bestätigen, wäre zu schlussfolgern, dass die kandidatengengestützte QTL-Analyse bei Tierpopulationen dieser Größe und dieses Designs selbst mit einem hohen Grad an Vorinformation über die Kandidatengene zur Validierung von QTL zwar geeignet, für die Suche nach einem QTN allerdings noch zu unpräzise ist.

#### <u>5.5 Fazit</u>

Actinobacillus pleuropneumoniae spielt durch seine weltweite Verbreitung und den durch die Erkrankung entstehenden immensen wirtschaftlichen Schaden eine wichtige Rolle, sowohl für die schweinehaltenden Betriebe als auch für die Fleischindustrie. Nicht nur deshalb, sondern auch im Interesse des Tierschutzes und der Verbraucher, sollte die Erforschung der genetischen Grundlage der Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz mit Nachdruck erfolgen. Sind die der Resistenz zugrundeliegenden DNA-Varianten bekannt, könnten sie züchterisch berücksichtigt werden. Weiterhin würden sie einen wertvollen Beitrag zur Erforschung von Pathogenese und Immunabwehr der Erkrankung, sowie von Stoffwechselwegen und Gennetzwerken liefern. Die vorliegende Dissertation trägt durch die Untersuchung der Assoziation verschiedener SNPs mit Phänotypen der Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz zur Vervollständigung des komplexen Bildes dieser Krankheitsresistenz folgendermaßen bei: Erstens konnten mithilfe des verwendeten Versuchsaufbaus Chromosomenbereiche auf SSC13 eingegrenzt werden, in denen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ein putatives QTN befindet (Konfidenzintervalle: TF: 7 cM; RAB6B: 15,5 cM, UPK1B: 22,5 cM). Dies ebnet den Weg für Folgestudien, die in diesen Bereichen gezielt nach kausalen Polymorphismen suchen können. Zweitens wurden mögliche Zusammenhänge zwischen den untersuchten Genen aufgedeckt (MYD88/RAB6B; MYD88/UPK1B; TF/RAB6B). Dieser Wissenszuwachs betreffend Gennetzwerken im Kontext der immunologischen Abwehr ist auch für die aufkommende genomische Selektion bedeutsam. Weiterhin ist durch diese zusätzliche Information eine differenziertere Gewichtung von SNPs in einem mathematischen Modell und dadurch eine verlässlichere Schätzung der genomischen Zuchtwerte möglich (Buske und Gengler 2009).

#### 6. Zusammenfassung

Die Aufklärung der genetischen Grundlagen der Krankheitsresistenz gegenüber dem weltweit verbreiteten Pathogen Actinobacillus pleuropneumoniae ist im Hinblick auf Tierschutz, Ökonomie und Vebrauchererwartung dringend notwendig. Assoziationsanalysen zu SNPs im Transferrin-Gen bzw. Untersuchungen zur Expression von Glykoproteinen oder Immunmarkern bei infizierten Schweinen wurden von verschiedenen Forschergruppen durchgeführt. Mit dem Respiratory Health Score wurde ein neues Bewertungsschema für die Schwere einer durch Actinobacillus pleuropneumoniae verursachten Lungenentzündung etabliert. In derselben Studie wurden Rassenunterschiede hinsichtlich der Krankheitsresistenz deutlich. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zur Aufklärung der der Krankheitsresistenz zugrundeliegenden Ursachen auf DNA-Ebene beizutragen. Zu diesem Zweck sollte mithilfe von SNPs in positionellen und funktionellen Kandidatengenen eine für Merkmale der Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz durchgeführte QTL-Analyse verbessert und die Lokalisation putativer QTN eingegrenzt werden. Als Grundlage dieser Untersuchungen diente eine gut charakterisierte F2-Familie aus im Merkmal Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz divergierenden Ausgangspopulationen der Rassen Hampshire und Deutsche Landrasse. Bei den 170 F2-Tieren wurden mittels Pyrosequenzierung jeweils die Genotypen für 7 SNPs aus den Kandiatengenen AHSG, IL12A, MYD88, TFRC und TF auf SSC13 bestimmt. QTL-Analysen für 17 klinische Merkmale und 5 eQTL wurden in drei Schritten mithilfe der Online-Applikation GridQTL durchgeführt. Als Grundgerüst dienten 9 Mikrosatelliten auf SSC13. In einem zweiten Schritt wurden die SNPs als zusätzliche Marker eingefügt und zuletzt als fixe Effekte betrachtet. Insgesamt ließen sich bis zu drei QTL-Bereiche auf SSC13 darstellen, die mit einem oder mehreren der untersuchten Phänotypen assoziiert waren. Durch die vorliegende Arbeit wurden: 1. Verbindungen zwischen dem untersuchten SNP in MYD88 und der RAB6B- bzw. UPK1B-Expression sowie zwischen dem untersuchten SNP in TF und der RAB6B Expression festgestellt. Diese weisen auf mögliche funktionale Zusammenhänge zwischen den beteiligten Genen hin; 2. Die Existenz und Lokalisation von QTL bestätigt. Hierzu zählen ein QTL bei 52 cM für die Transferrin-Expression sowie ein QTL bei 58 cM für die nach dem Respiratory Health Score (RHS) 50 am stärksten und 50 am wenigsten betroffenen Tiere; 3. Die Konfidenzintervalle einiger QTL verkleinert (RAB6B: QTL1; UPK1B, TF: QTL2), wodurch der Suchbereich für ein putatives QTN eingegrenzt wurde. Es konnte jedoch, trotz eines hohen Grades an Vorinformation, durch den verwendeten Kandidatengen-basierten Ansatz kein Rückschluss auf die genaue

Lage eines QTN für Actinobacillus pleuropneumoniae-Resistenz im Transferrin-Gen oder in den anderen Kandiatengenen gezogen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind, durch die Erhöhung der Genauigkeit der QTL-Lokalisation von Nutzen für eine Fortsetzung der Suche nach den der Resistenz/Empfänglichkeit zugrundeliegenden DNA-Varianten. Die Erkenntnisse hinsichtlich der Beziehungen zwischen den betrachteten Genen untereinander liefern einen Beitrag zum Verständnis der Abwehrprozesse im Wirt bei der Actinobacillus pleuropneumoniae-Infektion. Auch im Hinblick auf die bevorstehende flächendeckende Renaissance der Zuchtwertschätzung mithilfe genomabdeckender SNP-Chips und daraus resultierende genomische Selektion beim Schwein sind die Ergebnisse von SNP-Studien wie der vorliegenden von Wert. Mathematische Modelle, die mit kalkulierten SNP-Effekten arbeiten, können umso besser feinjustiert werden, je besser die betrachteten SNPs charakterisiert sind. Zukünftig sollte daher insbesondere die Suche nach SNPs, deren Genotypen mit einem hohen Anteil phänotypischer Varianz assoziiert sind fortgesetzt werden, beispielsweise Nutzung verbesserter Kartierungsverfahren oder unter Versuchstierpopulationen mit einer höheren Anzahl informativer Meiosen.

#### 6. Summary

Elucidation of the genetic background of genetically determined disease resistance against the wide spread pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* is urgently needed, especially with regard to animal welfare, economic considerations and consumer expectations. Different researchers have presented association analyses concerning SNPs in the transferrin gene or examined the expression of glycoproteins and immune markers in infected pigs, respectively. Furthermore, the Respiratory Health Score, a new scoring system to assess the degree of *Actinobacillus pleuropneomiae*-induced pneumonia has been established recently. These authors have also depicted significant differences among populations of Hampshire and German Landrace pigs regarding the degree of disease after challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The aim of the work at hand was to make a contribution to the discovery of factors influencing disease resistance on a DNA Level. In order to improve a QTL analysis for traits of disease resistance and for the further characterisation of the QTL found, SNPs in positional and functional candidate genes were identified. A well characterised F2 Family, built by crossing populations of the divergent breeds Hampshire and DL, served as a basis for the present investigation. 170 F2-animals were genotyped by pyrosequencing for 7 SNPs,

chosen from the candidate genes AHSG, IL12A, MYD88, TFRC and TF on SSC13. QTL analysis was performed in three steps for 17 clinical traits and 5 Cis-eQTL using the online application GridQTL. Three different protocols for repeated QTL-analysis were used. In a first step, the newly described SNPs were included consecutively as extra markers into the set of microsatellites of the recent QTL analysis. In the following step, these SNPs were regarded as fixed effects. The outcome of both analyses was compared with the recent QTL-analysis without extra markers. Altogether, we identified up to three QTL Regions on SSC13 which were associated with one or several of the disease resistance traits analysed. The present data provide evidence for interactions between the newly identified SNP in MYD88 and RAB6B and UPK1B gene expression respectively. Also, an influence of the SNP in TF on altered RAB6B gene expression was found. Consequently, a functional connection between these genes can be assumed. Furthermore, confidence intervals of some QTL (RAB6B: QTL1; UPK1B, TF: QTL2) were scaled down, restricting the area of interest on the way to identify the QTN. The existence and localisation of a transferrin-eQTL at 52 cM and a QTL for the 50 most and 50 least affected animals according to the Respiratory Health Score, at 58 cM were confirmed. However, the chosen candidate gene approach did not improve mapping of the actual QTL in the region of the transferrin gene or the other candidate genes in a way that a conclusion to a QTN localisation could be drawn. Nevertheless, further search for DNA variants causing differences in resistance/susceptibility towards Actinobacillosis will profit from the more exact QTL localisations found. Also, the revealed connections between genes can be of use for better understanding the mechanisms of host defense during an Actinobacillus pleuropneumoniae infection. Furthermore, findings from SNP studies provide basic information for genomic breeding value estimations, as they improve mathematical calculations for SNP effects. The better the used SNPs are characterised, the higher the exactness of the calculated effects will be. Consequently, the search for SNPs whose genotypes are associated with a great amount of phenotypic variance should be continued in the future, possibly by use of improved mapping procedures or test populations offering informative meioses in a high quantity.
### **Literaturverzeichnis**

### A

Abbott, E. M.; Parkins, J. J.; Holmes, P. H. (1984): Studies on the pathophysiology of chronic ovine haemonchosis in Merino and Scottish Blackface lambs. In: *Parasitology* 89 (03), S. 585–596.

Aderem, A.; Ulevitch, R. J. (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. In: *Nature* 406 (6797), S. 782–787.

Ahmadian, A.; Ehn, M.; Hober, S. (2006): Pyrosequencing: History, biochemistry and future. In: *Clinica Chimica Acta* 363 (1-2), S. 83–94.

Ai, H.; Ren, J.; Zhang, Z.; Ma, J.; Guo, Y.; Yang, B.; Huang, L. (2012): Detection of quantitative trait loci for growth- and fatness-related traits in a large-scale White Duroc × Erhualian intercross pig population. In: *Animal Genetics* 43 (4), S. 383–391.

Aisen, P. (2004): Transferrin receptor 1. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (11), S. 2137–2143.

Akira, S.; Hoshino, K. (2003): Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. In: *J Infect Dis* 187 Suppl 2, S. 356-63.

Akira, S.; Hoshino, K.; Kaisho, T. (2000): The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. In: *Journal of Endotoxin Research* 6 (5), S. 383–387.

Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T. (2001): Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. In: *Nat Immunol* 2 (8), S. 675–680.

Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801.

Albers, G.; Charagu, P. (2010): The Future of Genomic Selection in the Swine Industry. In: *Advances in Pork Production* 21, S. 271–275.

Andersson, L. (2001): Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. In: *Nat Rev Genet* 2 (2), S. 130–138.

Andersson, L.; Haley, C. S.; Ellegren, H.; Knott, S. A.; Johansson, M.; Andersson, K. et al. (1994): Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. In: *Science* 263 (5154), S. 1771–1774.

Archambault, M.; Labrie, J.; Rioux, C. R.; Dumas, F.; Thibault, P.; Elkins, C.; Jacques, M. (2003): Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobinbinding outer membrane protein of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1. In: *Can J Vet Res* 67 (4), S. 271–277.

Archibald, A. L.; Haley, C. S.; Brown, J. F.; Couperwhite, S.; McQueen, H. A.; Nicholson, D. et al. (1995): The PiGMaP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa). In: *Mamm Genome* 6 (3), S. 157–175.

Ardehali, R.; Shi, L.; Janatova, J.; Mohammad, S. F.; Burns, G. L. (2003): The inhibitory activity of serum to prevent bacterial adhesion is mainly due to apo-transferrin. In: *J. Biomed. Mater. Res.* 66 (1), S. 21–28.

Asou, N. (2003): The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 45 (2), S. 129–150.

### B

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. In: *Infect Immun* 63 (9), S. 3587–3594.

Bacon, L.D; Witter, R. L. (1993): Influence of B-Haplotype on the Relative Efficacy of Marek's Disease Vaccines of Different Serotypes. In: *American Association of Avian Pathologists* (37), S. 53–59.

Baker, John R.; Muller, Ralph (Hg.) (1982): Advances in parasitology. Academic Press Inc. (London) LTD., 24/28 Oval Road London NW1

Baltes, N.; Hennig-Pauka, I.; Gerlach, G.-F (2002): Both transferrin binding proteins are virulence factors in Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 7 infection. In: *FEMS Micobiology Letters* (209), S. 283–287.

Baltes, N.; Tonpitak, W.; Gerlach, G. F.; Hennig-Pauka, I.; Hoffmann-Moujahid, A.; Ganter, M.; Rothkotter, H. J. (2001): Actinobacillus pleuropneumoniae iron transport and urease

activity: effects on bacterial virulence and host immune response. In: *Infect Immun* 69 (1), S. 472–478.

Barenboim, M.; Manke, T. (2013): ChroMoS: an integrated web tool for SNP classification, prioritization and functional interpretation. In: *Bioinformatics* 29 (17), S. 2197–2198.

Beisswenger, C.; Lysenko, E. S.; Weiser, J. N. (2009): Early Bacterial Colonization Induces Toll-Like Receptor-Dependent Transforming Growth Factor Signaling in the Epithelium. In: *Infection and Immunity* 77 (5), S. 2212–2220.

Belanger, M.; Begin, C.; Jacques, M. (1995): Lipopolysaccarides of Actinobacillus pleuropneumoniae bind pig hemoglobin. In: *Infect Immun* 63 (2), S. 656–662.

Bellamy, R. (2000): Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africa: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. In: *Clinical Science* 98, S. 245–250.

Benga, L.; Hoeltig, D.; Rehm, T.; Rothkoetter, H.-J; Pabst, R.; Valentin-Weigand, P.; Iras, FUGATO-consortium (2009): Expression levels of immune markers in Actinobacillus pleuropneumoniae infected pigs and their relation to breed and clinical symptoms. In: *BMC Vet Res* 5 (1) 13

Bennewitz, J. (Hg.) (2009): Die Grundlagen der genomischen Selektion. Rinderworkshop. Uelzen, 17.-18.2.

Bennewitz, J.; Bielfeldt, J. (2012): Pietrain-Endstufeneber mit genomisch unterstützten Zuchtwerten. In: *Bauernblatt Schleswig-Holstein und Hamburg*, S. 51.

Benyamin, B.; McRae, A. F.; Zhu, G.; Gordon, S.; Henders, A. K.; Palotie, A. et al. (2009): Variants in TF and HFE Explain ~40% of Genetic Variation in Serum-Transferrin Levels. In: *The American Journal of Human Genetics* 84 (1), S. 60–65.

Berardi, M. J.; Sun, C.; Zehr, M.; Abildgaard, F.; Peng, J.; Speck, N. A.; Bushweller, J. H. (1999): The Ig fold of the core binding factor alpha Runt domain is a member of a family of structurally and functionally related Ig-fold DNA-binding domains. In: *Structure* 7 (10), S. 1247–1256.

Bernuth, H. von; Picard, C.; Puel, A.; Casanova, J.-L (2012): Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans. In: *Eur. J. Immunol.* 42 (12), S. 3126–3135.

Bertschinger, H. U.; Stamm, M.; Vögeli, P. (1993): Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: Experiments with an Escherichia coli strain expressing fimbriae 107. In: *Veterinary Microbiology* 35 (1–2), S. 79–89.

Bisset, S. A.; Morris, C. A.; McEwan, J. C.; Vlassof, A. (2001): Breeding sheep in New Zealand that are less reliant on anthelmintics to maintain health and productivity. In: *New Zealand Veterinary Journal* 49 (6), S. 236–246.

Blanco, I.; Canals, A.; Evans, G.; Mellencamp, M. A.; Cia, C.; Deeb, N. et al. (2008):
Differences in susceptibility to Haemophilus parasuis infection in pigs. In: *Can J Vet Res* 72 (3), S. 228–235.

Boddicker, N.; Waide, E. H.; Rowland, R. R. R.; Lunney, J. K.; Garrick, D. J.; Reecy, J. M.; Dekkers, J. C. M. (2012): Evidence for a major QTL associated with host response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus challenge. In: *Journal of Animal Science* 90 (6), S. 1733–1746.

Bomford, A. B.; Munro, H. N. (1985): Transferrin and its receptor: Their roles in cell function. In: *Hepatology* 5 (5), S. 870–875.

Bond, R.; Kim, J. Y.; Lloyd, D. H. (2005): Bovine and canine transferrin inhibit the growth of Malassezia pachydermatis in vitro. In: *Med Mycol* 43 (5), S. 447–451.

Borevitz, J. O.; Chory, J. (2004): Genomics tools for QTL analysis and gene discovery. In: *Current Opinion in Plant Biology* 7 (2), S. 132–136.

Botstein, D.; White, R.L; Skolnick, M.; Davis, R.W (1980): Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. In: *American Journal of Human Genetics* (32), S. 314–331.

Brem, R. B.; Kruglyak, L. (2005): The landscape of genetic complexity across 5,700 gene expression traits in yeast. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (5), S. 1572–1577.

Brockmeier, Susan L. (2004): Prior infection with Bordetella bronchiseptica increases nasal colonization by Haemophilus parasuis in swine. In: *Veterinary Microbiology* 99 (1), S. 75–78.

Broke, A.; Matika, O.; Wilson, A. D.; Anderson, J.; Morin, A.-C; Finlayson, H. A. et al. (2011): An intronic polymorphism in the porcine IRF7 gene is associated with better health and immunity of the host during Sarcocystis infection, and affects interferon signalling. In: *Animal Genetics* 42 (4), S. 386–394.

Brown, W. M.; Dziegielewska, K. M.; Saunders, N. R.; Christie, D. L.; Nawratil, P.; Müller-Esterl, W. (1992): The nucleotide and deduced amino acid structures of sheep and pig fetuin. In: *European Journal of Biochemistry* (205), S. 321–331.

Buske, B.; Gengler, N. (2009): Genomische Selektion: ein Meilenstein auch in der Schweinezucht? In: *Schweinezucht aktuell* (35), S. 28–29.

## С

Cai, S.; Batra, S.; Shen, L.; Wakamatsu, N.; Jeyaseelan, S. (2009): Both TRIF- and MyD88-Dependent Signaling Contribute to Host Defense against Pulmonary Klebsiella Infection. In: *The Journal of Immunology* 183 (10), S. 6629–6638.

Calus, M. P. L. (2010): Genomic breeding value prediction: methods and procedures. In: *Animal* 4 (02), S. 157-164

Camaschella C.; Roetto, A.; Gobbi, M. de (2002): Genetic haemochromatosis: genes and mutations associated with iron loading. In: *Best Practice & Research Clinical Hematology* 15 (2), S. 261–276.

Campos, M.A; Closel, M.; Valente, E.P; Cardoso, J.E; Akira, S.; Alvarez-Leite, J.I et al. (2004): Impaired Production of Proinflammatory Cytokines and Host Resistance to Acute Infection with Trypanosoma cruzi in Mice Lacking Functional Myeloid Differentiation Factor 88. In: *The Journal of Immunology* 172 (3), S. 1711–1718.

Carter, Q. L.; Curiel, R. E. (2005): Interleukin-12 (IL-12) ameliorates the effects of porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) infection. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 107 (1-2), S. 105–118.

Cesano, A.; Visonneau, S.; Clark, S. C.; Santoli, D. (1993): Cellular and molecular mechanisms of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cells by IL-12. In: *The Journal of Immunology* 151 (6), S. 2943–2957.

Chasman, D.; Adams, R. M. (2001): Predicting the Functional Consequences of Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphisms: Structure-based Assessment of Amino Acid Variation. In: *Journal of Molecular Biology* (307), S. 683–706.

Chen, C.-Y; Lin, L.-I; Tang, J.-L; Ko, B.-S; Tsay, W.; Chou, W.-C et al. (2007): RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome - the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. In: *British Journal of Haematology* 139 (3), S. 405–414.

Chen, M.; Aosai, F.; Norose, K.; Mun, H-S; Takeuchi, O.; Akira, S.; Yano, A. (2002): Involvement of MyD88 in Host Defense and the Down-Regulation of Anti–Heat Shock Protein 70 Autoantibody Formation by MyD88 in Toxoplasma gondii–Infected Mice. In: *Journal of Parasitology* 88 (5), S. 1017–1019.

Chesler, E. J.; Lu, L.; Shou, S.; Qu, Y.; Gu, J.; Wang, J. et al. (2005): Complex trait analysis of gene expression uncovers polygenic and pleiotropic networks that modulate nervous system function. In: *Nat Genet* 37 (3), S. 233–242.

Cho, W.-S; Jung, K.; Kim, J.; Ha, Y.; Chae, C. (2005): Expression of mRNA Encoding Interleukin (IL)-10, IL-12p35 and IL-12p40 in Lungs from Pigs Experimentally Infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. In: *Veterinary Research Communications* 29 (2), S. 111– 122.

Chow, E. K.; O'Connell, R. M.; Schilling, S.; Wang, X.-F; Fu, X.-Y; Cheng, G. (2005): TLR agonists regulate PDGF-B production and cell proliferation through TGF-β/type I IFN crosstalk. In: *The EMBO Journal* 24 (23), S. 4071–4081.

Chung, H.-K; Chae, C. (2003): Expression of Interleukin-10 and Interleukin-12 in Piglets Experimentally Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). In: *Journal of Comparative Pathology* 129 (2-3), S. 205–212.

Churchill, A.E; Payne, L.N; Chubb, R.C (1969): Immunization against Marek's Disease using a Live Attenuated Virus. In: *Nature* (221), S. 744–747.

Churchill, G. A.; Doerge, R. W. (1994): Empirical threshold values for quantitative trait mapping. In: *Genetics* 138 (3), S. 963–971.

Cohen, J. (1988): Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. 2. Aufl. Hillsdale, N.J. USA: Lawrence Erlbaum Ass. Publishers.

Coltman, D. W.; Wilson, K.; Pilkington, J. G.; Stear, M. J.; Pemberton, J. M. (2001): A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. In: *Parasitology* 122 (5), S. 571–582.

Coste, I.; Le Corf, K.; Kfoury, A.; Hmitou, I.; Druillennec, S.; Hainaut, P. et al. (2010): Dual function of MyD88 in RAS signaling and inflammation, leading to mouse and human cell transformation. In: *J. Clin. Invest.* 120 (10), S. 3663–3667.

Couillin, I.; Vasseur, V.; Charron, S.; Gasse, P.; Tavernier, M.; Guillet, J. et al. (2009): IL-1R1/MyD88 Signaling Is Critical for Elastase-Induced Lung Inflammation and Emphysema. In: *The Journal of Immunology* 183 (12), S. 8195–8202.

Courtin, D.; Berthier, D.; Thevenon, S.; Dayo, G.-K; Garcia, A.; Bucheton, B. (2008): Host genetics in African trypanosomiasis. In: *Infection, Genetics and Evolution* 8 (3), S. 229–238.

Cox Matise, T.; Perlin, M.; Chakravarti, A. (1994): Automated construction of genetic linkage maps using an expert system (Multimap): a human genome linkage map. In: *Nature Genetics* (6), S. 384–390.

Cuesta Gerveno, J. M.; Risco Perez, D.; Goncalves Blanco, P.; Garcia Jimenez, W. L.; Gil Molino, M.; Fernandez-Llario, P. et al. (2013): Fatal infection due to Haemophilus parasuis in a young wild boar (Sus scrofa). In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25 (2), S. 297–300.

# D

**D**aniels, T. R.; Delgado, T.; Rodriguez, J. A.; Helguera, G.; Penichet, M. L. (2006): The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. In: *Clin Immunol* 121 (2), S. 144–158.

Danilowicz, E.; Martinez-Arias, R.; Dolf, G.; Singh, M.; Probst, I.; Tümmler, B. et al. (2009): Characterization of the porcine transferrin gene (TF) and its association with disease severity following an experimental Actinobacillus pleuropneumoniae infection. In: *Animal Genetics 41*, S. 424-426

DanZucht (Hg.) (2011): Genomische Selektion.

Darvasi, A. (1998): Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. In: *Nat Genet* 18 (1), S. 19–24.

Darvasi, A.; Soller, M. (1994): Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. In: *Theoret. Appl. Genetics* 89 (2-3), S. 351-357.

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 genetic map. In: *Genetics* 134 (3), S. 943–951.

Davies, G.; Stear, M. J.; Benothman, M.; Abuagob, O.; Kerr, A.; Mitchell, S.; Bishop, S. C. (2006): Quantitative trait loci associated with parasitic infection in Scottish blackface sheep. In: *Heredity* 96 (3), S. 252–258.

Dekkers, J. C. M. (2004): Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. In: *Journal of Animal Science* (82 (E. Suppl.)), S. 313–328

Deneer, H. G.; Potter, A. A. (1989): Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae. In: *Infect Immun* 57 (3), S. 798–804.

Dominik, S. (2005): Quantitative trait loci for internal nematode resistance in sheep: a review. In: *Genet Sel Evol* 37 (Suppl 1), S. 83

Dowling, P.; Clarke, C.; Hennessy, K.; Torralbo-Lopez, B.; Ballot, J.; Crown, J. et al. (2012):
Analysis of acute-phase proteins, AHSG, C3, CLI, HP and SAA, reveals distinctive
expression patterns associated with breast, colorectal and lung cancer. In: *Int. J. Cancer* 131
(4), S. 911–923.

Dowling, P.; O'Driscoll, L.; Meleady, P.; Henry, M.; Roy, S.; Ballot, J. et al. (2007): 2-D difference gel electrophoresis of the lung squamous cell carcinomaversus normal sera demonstrates consistent alterations in the levels of ten specific proteins. In: *Electrophoresis* 28 (23), S. 4302–4310.

Drennan, M.B; Stijlemans, B.; van Den Abbeele, J.; Quesniaux, V. J.; Barkhuizen, M.; Brombacher, F. et al. (2005): The Induction of a Type 1 Immune Response following a Trypanosoma brucei Infection Is MyD88 Dependent. In: *The Journal of Immunology* 175 (4), S. 2501–2509.

Dubreuil, J. D.; Jacques, M.; Mittal, K. R.; Gottschalk, M. (2000): Actinobacillus pleuropneumoniae surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. In: *Anim Health Res Rev* 1 (2), S. 73–93.

Dwivedi, V.; Manickam, C.; Binjawadagi, B.; Linhares, D.; Murtaugh, M. P.; Renukaradhya, G. J. (2012): Evaluation of immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs during early stage of infection under farm conditions. In: *Virol J* 9 (1), S. 45.

Dziegielewska, K.; Brown, W. M.; Deal, A.; Foster, K. A.; Fry, E. J.; Saunders, N. R. (1996): The expression of fetuin in the development and maturation of the hemopoietic and immune systems. In: *Histochem Cell Biol* 106 (3), S. 319–330.

#### E

Eckert, J. (2008): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 112 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart: Enke. ISBN: 978-3830410324

Edfors-Lilja, I.; Gustafsson, U.; Duval-Iflah, Y.; Ellergren, H.; Johansson, M.; Juneja, R. K. et al. (1995): The porcine intestinal receptor for Escherichia coli K88 ab, K88 ac. Regional localization on chromosome 13 and influence of IgG response to the K88 antigen. In: *Animal Genetics* 26 (4), S. 237–242.

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. In: *The Journal of Immunology* 161 (2), S. 829–835.

efsa (European Food Safety Agency) (2010): Scientific Opinion on a Quantitative Microbial Risk Assessment of Salmonella in slaughter and breeder pigs. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). In: *EFSA Journal* (8 (4)), S. 1–90.

Elsik, C. G.; Tellam, R. L.; Worley, K. C.; Gibbs, R. A.; Muzny, D. M.; Weinstock, G. M. et al. (2009): The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. In: *Science* 324 (5926), S. 522–528.

Eppig, J. T. (1996): Comparative maps: adding pieces to the mammalian jigsaw puzzle. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (6), S. 723–730.

Ewald, C.; Appel, G.; Mickwitz, G. v. (1989): Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumonie der Schweine. In: *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 102 (1), S. 6–11.

#### F

Fakruddin, M.; Chowdhury, A. (2012): Pyrosequencing-An Alternative to Traditional Sanger Sequencing. In: *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 8 (1), S. 14–20.

Falconer, D. S.; Mackay, T. F. C. (1996): Introduction to quantitative genetics. 4. Aufl. Essex, England: Longman.

FAO (2007): The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. Rome: FAO. Faul, F.; Erdfelder, E.; Buchner, A.; Lang, A.-G (2009): Statistical power analyses using
G\*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. In: *Behavior Research Methods*41 (4), S. 1149–1160.

Feder, J.N; Gnirke, A.; Thomas, W.; Tsuchihashi, Z.; Ruddy, D.A; Basava, A. et al. (1996): A novel MHC class I–like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. In: *Nat Genet* 13 (4), S. 399–408.

Fernández-Real, J. M.; Mercader, J. M.; Ortega, F. J.; Moreno-Navarrete, J. M.; López-Romero, P.; Ricart, W. (2010): Transferrin receptor-1 gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes. In: *European Journal of Clinical Investigation* 40 (7), S. 600–607.

Foss, D. L.; Murtaugh, M. P. (1997): Molecular cloning and mRNA expression of porcine interleukin-12. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 57 (1–2), S. 121–134.

Frönicke, L.; Chowdhary, B. P.; Scherthan, H.; Gustavsson, I. (1996): A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. In: *Mammalian Genome* (7), S. 285–290.

Fu, Wei-Xuan; Liu, Yang; Lu, Xin; Niu, Xiao-Yan; Ding, Xiang-Dong; Liu, Jian-Feng et al. (2012): A Genome-Wide Association Study Identifies Two Novel Promising Candidate Genes Affecting Escherichia coli F4ab/F4ac Susceptibility in Swine. In: *PLoS ONE* 7 (3), e32127.

FUGATO (2004): Genomanalyse -Neue Dimensionen für die Tierzucht. Online verfügbar unter http://www.fugato-

forschung.de/genomanalyse\_neue\_dimensionen\_fuer\_die\_tierzucht.html

### G

Gaidzik, V. I.; Bullinger, L.; Schlenk, R. F.; Zimmermann, A. S.; Rock, J.; Paschka, P. et al. (2011): RUNX1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Results From a Comprehensive Genetic and Clinical Analysis From the AML Study Group. In: *Journal of Clinical Oncology* 29 (10), S. 1364–1372..

Galina-Pantoja, L.; Siggens, K.; van Schriek, M. G. M.; Heuven, H. C. M. (2009): Mapping markers linked to porcine salmonellosis susceptibility. In: *Animal Genetics* 40 (6), S. 795–803.

Gately, M. K.; Renzetti, L. M.; Magram, J.; Stern, A. S.; Adorini, L.; Gubler, U.; Presky, D. H. (1998): THE INTERLEUKIN-12/INTERLEUKIN-12-RECEPTOR SYSTEM: Role in Normal and Pathologic Immune Responses. In: *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1), S. 495–521.

Gauly, M.; Erhardt, G. (2001): Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Rhon sheep following natural infection. In: *Vet Parasitol* 102 (3), S. 253–259.

Gavora, J. S.; Spencer, J. L. (1979): Studies on genetic resistance of chickens to Marek's disease—A review. In: *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2 (2–3), S. 359–371.

Geldermann, H. (1975): Investigations on Inheritance of Quantitative Characters in Animals by Gene Markers. I. Methods. In: *Theor. Appl. Genet.* (46), S. 319–330.

Geldermann, H. (2005): Tier-Biotechnologie. Unter Mitarbeit von H. Bartenschlager, J. Gogol, S. Preuß, B. Brenig, M. Büttner, G. Erhardt et al. 1. Aufl. Stuttgart: Eugen Ulmer. ISBN: 978-3-8252-8283-7

Georges, M. (2007): Mapping, Fine Mapping, and Molecular Dissection of Quantitative Trait Loci in Domestic Animals. In: *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* 8 (1), S. 131–162.

Gericke, B.; Claus, H.; Voigt, M.; Tschäpe, H.; Rasch, G. et al. (1999): Die epidemiologische Situation der Salmonellose in Deutschland 1997. In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 42 (3), S. 196–205.

Gerlach, G.-F; Klashinsky, S.; Anderson, C.; Potter, A. A.; Willson, P. J. (1992): Characterization of Two Genes Encoding Distinct Transferrin-Binding Proteins in Different Actinobacillus pleuropneumoniae Isolates. In: *Infect Immun* 60 (8), S. 3253–3261.

GERMAP 2012: Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Hrsg: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.; Infektiologie Freiburg. Verlag: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 2014. ISBN: 978-3-00-045503-2

Geverink, N. A.; Foury, A.; Plastow, G. S.; Gil, M.; Gispert, M.; Hortos, M. et al. (2006): Cortisol-binding globulin and meat quality in five European lines of pigs. In: *J Anim Sci* 84 (1), S. 204–211. Gibbons, R.A; Sellwood, R.; Burrows, M.; Hunter, P.A (1977): Inheritance of resistance to neonatal E. coli diarrhoea in the pig: examination of the genetic system. In: *Theor. Appl. Genet.* (51), S. 65–70.

Gibson, G.; Weir, B. (2005): The quantitative genetics of transcription. In: *Trends in Genetics* 21 (11), S. 616–623.

Gimeno, I. M. (2008): Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow? In: *Vaccine* 26, S. C31–C41.

Girelli, D.; Bozzini, C.; Roetto, A.; Alberti, F.; Daraio, F.; Colombari, R. et al. (2002): Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene. In: *Gastroenterology* 122 (5), S. 1295–1302.

Goddard, M. E.; Hayes, B. J.; Meuwissen, T. H. E. (2010): Genomic selection in livestock populations. In: *Genet. Res.* 92 (5-6), S. 413–421.

Golding, N.; Small, R. W. (2009): The relative resistance to gastrointestinal nematode infection of three British sheep breeds. In: *Research in Veterinary Science* 87 (2), S. 263–264.

Gonzalez, G. C.; Caamano, D. L.; Schryvers, A. B. (1990): Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in Actinobacillus pleuropneumoniae. In: *Molecular Microbiology* 4 (7), S. 1173–1179.

Gottschalk, M. (2012): Actinobacillosis. In: J. J. Karriker L. A. Zimmerman, A. Ramirez, K.J Schwartz und G.W Stevenson (Hg.): Diseases of swine. 10. Aufl. Chichester, West Sussex, Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, S. 653–669.

Graw, J. (2010): Genetik. 5. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer Berlin (Springer-Lehrbuch). ISBN: 978-3642049989

Gregersen, V. R.; Conley, L. N.; Sørensen, K. K.; Guldbrandtsen, B.; Velander, I. H.; Bendixen, C. (2012): Genome-wide association scan and phased haplotype construction for quantitative trait loci affecting boar taint in three pig breeds. In: *BMC Genomics* 13 (1)

Gregersen, V. R.; Sørensen, K. K.; Christensen, O. F.; Busch, M. E.; Vingborg, R. K. K.; Velander, I. H. et al. (2010): Identification of QTL for dorso-caudal chronic pleuritis in 12 crossbred porcine families. In: *Animal Genetics* 41 (5), S. 509–514.

Groenen, M. A. M.; Archibald, A. L.; Uenishi, H.; Tuggle, C. K.; Takeuchi, Y.; Rothschild, M. F. et al. (2012): Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. In: *Nature* 491 (7424), S. 393–398.

Gross, C. N. Irrinki A.; Feder, J. N.; Enns, C. A. (1998): Co-trafficking of HFE, a Nonclassical Major Histocompatibility Complex Class I Protein, with the Transferrin Receptor Implies a Role in Intracellular Iron Regulation. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (34), S. 22068–22074.

Gubler, U.; Chua, A. O.; Schoenhaut, D. S.; Dwyer, C. M.; McComas, W.; Motyka, R. et al. (1991): Coexpression of two distinct genes is required to generate bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (10), S. 4143–4147.

Guérin, G.; Bertaud, M.; Duval-Iflah, Y.; Bonneau, M.; Guillaume, P.; Ollivier, L. (1993): Evidence for linkage between K88ab, K88ac intestinal receptors to Escherichia coli and transferrin loci in pigs. In: *Animal Genetics* 24 (5), S. 393–396.

# H

Habashy, H. O.; Powe, D. G.; Staka, C. M.; Rakha, E. A.; Ball, G.; Green, A. R. et al. (2010): Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. In: *Breast Cancer Res Treat* 119 (2), S. 283–293.

Haesebrouck, F.; Chiers, K.; van Overbeke, I.; Ducatelle, R. (1997): Actinobacillus pleuropneumoniae infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. In: *Veterinary Microbiology* (58), S. 239–249.

Halbur, P.G; Rothschild, M. F.; Thacker, B.J; Meng, X.-J; Paul, P.S; Bruna, J.D (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 (PRRSV). In: *J. Anim. Breed. Genet.* (115), S. 181–189.

Haley, C. S.; Knott, S. A. (1992): A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. In: *Heredity (Edinb)* 69 (4), S. 315–324.

Hanotte, O.; Ronin, Y.; Agaba, M.; Nilsson, P.; Gelhaus, A.; Horstmann, R. et al. (2003): Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (13), S. 7443–7448.

Hart, S. P.; Jackson, C.; Kremmel, L. M.; McNeill, M. S.; Jersmann, H.; Alexander, K. M. et al. (2003): Specific binding of an antigen-antibody complex to apoptotic human neutrophils. In: *Am J Pathol* 162 (3), S. 1011–1018. Hayashi, F.; Smith, K. D.; Ozinsky, A.; Hawn, T. R.; Yi, E. C.; Goodlett, D. R. et al. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. In: *Nature* 410 (6832), S. 1099–1103.

Hayashi, K.; Natsume, W.; Watanabe, T.; Abe, N.; Iwai, N.; Okada, H. et al. (2000): Diminution of the AML1 Transcription Factor Function Causes Differential Effects on the Fates of CD4 and CD8 Single-Positive T Cells. In: *The Journal of Immunology* 165 (12), S. 6816–6824.

Hayashi, T.; Awata, T.; Yasue, H. (2002): On the efficiency of composite interval mapping in an outbred population. In: *Genes Genet Syst* 77 (3), S. 209–217.

Hayes, B.; Goddard, M. (2010): Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. In: *Genome* 53 (11), S. 876–883.

Hayes, B.J; Bowman, P.J; Chamberlain, A.J; Goddard, M.E (2009): Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. In: *Journal of Dairy Science* 92 (2), S. 433–443.

Hedegaard, J.; Skovgaard, K.; Mortensen, S.; Sørensen, P.; Jensen, T. K.; Hornshøj, H. et al. (2007): Molecular characterisation of the early response in pigs to experimental infection with Actinobacillus pleuropneumoniae using cDNA microarrays. In: *Acta Vet Scand* 49 (1), S. 11-22

Hegde, P. S.; White, I. R.; Debouck, C. (2003): Interplay of transcriptomics and proteomics. In: *Current Opinion in Biotechnology* 14 (6), S. 647–651.

Heifetz, E. M.; Fulton, J. E.; O'Sullivan, N. P.; Arthur, J. A.; Cheng, H.; Wang, J. et al. (2009): Mapping QTL affecting resistance to Marek's disease in an F6 advanced intercross population of commercial layer chickens. In: *BMC Genomics* 10 (1)

Hein, W. R.; Pernthaner, A.; Piedrafita, D.; Meeusen, E. N. (2010): Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep. In: *Parasite Immunology 32*, S.541-548

Heinzel, F. P.; Schoenhaut, D. S.; Rerko, R. M.; Rosser, L. E.; Gately, M. K. (1993):
Recombinant interleukin 12 cures mice infected with Leishmania major. In: *J Exp Med* 177 (5), S. 1505–1509.

Hemmi, H.; Kaisho, T.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Sanjo, H.; Hoshino, K. et al. (2002): Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88–dependent signaling pathway. In: *Nat. Immunol.* 3 (2), S. 196–200.

Hennige, A. M.; Staiger, H.; Wicke, C.; Machicao, F.; Fritsche, A.; Häring, H.-U et al. (2008): Fetuin-A Induces Cytokine Expression and Suppresses Adiponectin Production. In: *PLoS ONE* 3 (3), e1765

Hennig-Pauka, I.; Bremerich, S.; Nienhoff, H.; Schröder, C.; Verspohl, J.; Strutzberg-Minder,
K. et al. (2007): Respiratory Disease Markers in Porcine Bronchoalveolar Lavage Fluid. In: J
Vet Med Series A 54 (8), S. 434–440.

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. In: *Vet. Res.* 37 (1), S. 75–87.

Hildebrand, C.E; Torney, D.C; Wagner, R.P (1992): Informativeness of Polymorphic DNA Markers. In: *Los Alamos Science* (20), S. 100–102.

Höltig, D.; Hennig-Pauka, I.; Thies, K.; Rehm, T.; Beyerbach, M.; Strutzberg-Minder, K. et al. (2009): A novel clinical scoring system reveals the role of innate immunity and breed in resistance to Actinobacillus pleuropneumoniae infection. In: *BMC Vet Res* 5 (1) 14

Hsieh, C.; Macatonia, S.; Tripp, C.; Wolf, S.; O'Garra, A.; Murphy, K. (1993): Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. In: *Science* 260 (5107), S. 547–549.

Hu, X.; Gao, Y.; Feng, C.; Liu, Q.; Wang, X.; Du, Z. et al. (2009): Advanced technologies for genomic analysis in farm animals and its application for QTL mapping. In: *Genetica* 136 (2), S. 371–386.

Huang, B.E; Lin, D.Y (2007): Efficient Association Mapping of Quantitative Trait Loci with Selective Genotyping. In: *The American Journal of Human Genetics* 80 (3), S. 567–576.

#### Ι

Ibañez-Escriche, N.; Gonzalez-Recio, O. (2011): Review. Promises, pitfalls and challenges of genomic selection in breeding programs. In: *Span J Agric Res* 9 (2), S. 404-413

Iraqi, F.; Clapcott, S. J.; Kumari, P.; Haley, C.S; Kemp, S. J.; Teale, A. J. (2000): Fine mapping of trypanosomiasis resistance loci in murine advanced intercross lines. In: *Mammalian Genome* 11 (8), S. 645–648.

#### J

Jacobsen, I.; Gerstenberger, J.; Gruber, A. D.; Bosse, J. T.; Langford, P. R.; Hennig-Pauka, I. et al. (2005): Deletion of the ferric uptake regulator Fur impairs the in vitro growth and virulence of Actinobacillus pleuropneumoniae. In: *Infect Immun* 73 (6), S. 3740–3744.

Jacobsen, M.; Kracht, S. S.; Esteso, G.; Cirera, S.; Edfors, I.; Archibald, A. L. et al. (2010): Refined candidate region specified by haplotype sharing for Escherichia coli F4ab/F4ac susceptibility alleles in pigs. In: *Animal Genetics* 41 (1), S. 21–25.

Jacques, M. (2004): Surface polysaccarides and iron-uptake systems of Actinobacillus pleuropneumoniae. In: *Can J Vet Res* (68), S. 81–85.

Janeway, C. A. (2002): Immunologie. 5. Aufl. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl. (Spektrum-Lehrbuch).

Janeway, C. A.; Medzhitov, R. (2002): Innate Immune Recognition. In: *Annu. Rev. Immunol.* 20 (1), S. 197–216.

Jansen, R. C.; Nap, J. P. (2001): Genetical genomics: the added value from segregation. In: *Trends Genet* 17 (7), S. 388–391.

Janssens, S.; Burns, K.; Tschopp, J.; Beyaert, R. (2002): Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. In: *Curr Biol* 12 (6), S. 467–471.

Jirawattanapong, P.; Stockhofe-Zurwieden, N.; van Leengoed, L.; Wisselink, H.; Raymakers, R.; Cruijsen, T. et al. (2010): Pleuritis in slaughter pigs: Relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis. In: *Research in Veterinary Science* 88 (1), S. 11–15.

Johnson, E. E.; Wessling-Resnick, M. (2012): Iron metabolism and the innate immune response to infection. In: *Microbes and Infection* 14 (3), S. 207–216.

Jorgensen, C.B; Cirera, S.; Anderson, S.I; Archibald, A.L; Raudsepp, T.; Chowdhary, B. et al. (2003): Linkage and comparative mapping of the locus controlling susceptibility towards *E. coli* F4ab/ac diarrhoea in pigs. In: *Cytogenet Genome Res* 102 (1-4), S. 157–162.

Ju, Z.H; Li, Q.L; Huang, J.M; Hou, M.H; Li, R.L; Li, J.B et al. (2011): Three novel SNPs of the bovine Tf gene in Chinese native cattle and their associations with milk production traits. In: *Genet. Mol. Res.* 10 (1), S. 340–352.

## K

Kahlisch, D.; Buettner, F. F. R.; Naim, H. Y.; Gerlach, G.-F; Iras, FUGATO-consortium (2009): Glycoprotein analysis of porcine bronchoalveolar lavage fluid reveals potential biomarkers corresponding to resistance to Actinobacillus pleuropneumoniae infection. In: *Vet. Res.* 40 (6), S. 60-74

Kaisho, T.; Akira, S. (2001): Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88knockout mice. In: *Trends Immunol* 22 (2), S. 78–83.

Kallin, B.; Martin, R. de; Etzold, T.; Sorrentino, V.; Philipson, L. (1991): Cloning of a growth arrest-specific and transforming growth factor beta-regulated gene, TI 1, from an epithelial cell line. In: *Mol Cell Biol* 11 (10), S. 5338–5345.

Kawabata, H.; Yang, R.; Hirama, T.; Vuong, P. T.; Kawano, S.; Gombart, A. F.; Koeffler, H.
P. (1999): Molecular Cloning of Transferrin Receptor 2. A NEW MEMBER OF THE
TRANSFERRIN RECEPTOR-LIKE FAMILY. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (30),
S. 20826–20832.

Kawai, T.; Akira, S. (2007): Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. In: *Trends Mol Med* 13 (11), S. 460–469.

Kearsey, M.J (1998): The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). In: *Journal of Experimental Botany* 49 (327), S. 1619–1623.

Kemp, S. J.; Darvasi, A.; Soller, M.; Teale, A. J. (1996): Genetic control of resistance to trypanosomiasis. In: *Proceedings of the International Veterinary Immunology Symposium* 54 (1–4), S. 239–243.

Khachatourians, G. G. (1998): Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. In: *CMAJ* 159 (9), S. 1129–1136.

Kim, J.-J; Rothschild, M. F.; Beever, J.; Rodriguez-Zas, S.; Dekkers, J. C. M. (2005): Joint analysis of two breed cross populations in pigs to improve detection and characterization of quantitative trait loci. In: *Journal of Animal Science* 83 (6), S. 1229–1240.

Kissebah, A. H.; Sonnenberg, G. E.; Myklebust, J.; Goldstein, M.; Broman, K.; James, R. G. et al. (2000): Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (26), S. 14478–14483.

Klinge, Kelly L.; Vaughn, Eric M.; Roof, Michael B.; Bautista, Elida M.; Murtaugh, Michael P. (2009): Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. In: *Virol J* 6 (1)

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. In: *BMC Genomics* 11 (1)

Kobayashi, M.; Fitz, L.; Ryan, M.; Hewick, R. M.; Clark, S. C.; Chan, S. et al. (1989): Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. In: *J Exp Med* 170 (3), S. 827–845.

Koning, D. J. de; Cabrera, C. P.; Haley, C. S. (2007): Genetical Genomics: Combining Gene Expression with Marker Genotypes in Poultry. In: *Poultry Science* 86 (7), S. 1501–1509.

Koning, D. J. de; Janss, L. L.; Rattink, A. P.; van Oers, P. A.; Vries, B. J. de; Groenen, M. A. et al. (1999): Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (Sus scrofa). In: *Genetics* 152 (4), S. 1679–1690.

Kratz, F.; Hartmann, M.; Keppler, B.; Messori, L. (1994): The Binding Properties of Two Antitumor Ruthenium (III) Complexes to Apotransferrin. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269 (4), S. 2581–2588.

Kucerova, Z.; Hradecka, H.; Nechvatalova, K.; Nedbalcova, K. (2011): Antimicrobial susceptibility of Actinobacillus pleuropneumoniae isolates from clinical outbreaks of porcine respiratory diseases. In: *Veterinary Microbiology* 150 (1-2), S. 203–206.

Kurokawa, M.; Hirai, H. (2003): Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. In: *Cancer Science* 94 (10), S. 841–846.

#### L

Lander, E. S.; Botstein, D. (1989): Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. In: *Genetics* 121 (1), S. 185–199.

Lee, P. L.; Barton, J. C. (2006): Hemochromatosis and Severe Iron Overload Associated with Compound Heterozygosity for *TFR2* R455Q and Two Novel Mutations *TFR2* R396X and G792R. In: *Acta Haematol* 115 (1-2), S. 102–105.

Levy, J. E.; Jin, O.; Fujiwara, Y.; Kuo, F.; Andrews, N. C. (1999): Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. In: *Nat Genet* 21 (4), S. 396–399.

Li, H.; Qian, Z. M. (2002): Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. In: *Med Res Rev* 22 (3), S. 225–250.

Lieu, P. T.; Heiskala, M.; Peterson, P. A.; Yang, Y. (2001): The roles of iron in health and disease. In: *Mol Aspects Med* 22 (1-2), S. 1–87.

Liew, F. Y.; Xu, D.; Brint, E. K.; O'Neill, L. A. J. (2005): Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. In: *Nat Rev Immunol* 5 (6), S. 446–458.

Lillehammer, M.; Meuwissen, T. H. E.; Sonesson, A. K. (2011): Genomic selection for maternal traits in pigs. In: *Journal of Animal Science* 89 (12), S. 3908–3916.

Lillehammer, M.; Meuwissen, T. H. E.; Sonesson, A. K. (2013): Genomic selection for two traits in a maternal pig breeding scheme. In: *Journal of Animal Science* 91 (7), S. 3079–3087.

Liu, H.-C; Cheng, H. H.; Tirunagaru, V.; Sofer, L.; Burnside, J. (2001(b)): A strategy to identify positional candidate genes conferring Mareks disease resistance by integrating DNA microarrays and genetic mapping. In: *Animal Genetics* (32), S. 351–359.

Liu, H.-C; Kung, H.-J; Fulton, J. E.; Morgan, R. W.; Cheng, H. H. (2001(a)): Growth hormone interacts with the Marek's disease virus SORF2 protein and is associated with disease resistance in chicken. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (16), S. 9203–9208.

Liu, H.-C; Niikura, M.; Fulton, J.E; Cheng, H.H (2003): Identification of chicken lymphocyte antigen 6 complex, locus E (*LY6E*, alias *SCA2*) as a putative Marek's disease resistance gene via a virus-host protein interaction screen. In: *Cytogenet Genome Res* 102 (1-4), S. 304–308.

Lo Coco, F.; Pisegna, S.; Diverio, D. (1997): The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. In: *Haematologica* 82 (3), S. 364–370.

Longenecker, B. M.; Pazderka, F.; Gavora, J. S.; Spencer, J. L.; Ruth, R. F. (1976): Lymphoma induced by herpesvirus: Resistance associated with a major histocompatibility gene. In: *Immunogenetics* 3 (1), S. 401-407. Losinger, W. C. (2005): Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of Actinobacillus pleuropneumoniae on grower/finisher swine operations in the United States. In: *Preventive Veterinary Medicine* 68 (2-4), S. 181–193.

Lukeš, J.; Raper, J. (2010): Prophylactic Antiparasitic Transgenesis for Human Parasitic Disease? In: *Mol Ther* 18 (10), S. 1745–1747.

Luo, Z. W.; Wu, Chung-I; Kearsey, M. J. (2002): Precision and high-resolution mapping of quantitative trait loci by use of recurrent selection, backcross or intercross schemes. In: *Genetics* 161 (2), S. 915–929.

### Μ

MacInnes, J.; Rosendal, S. (1988): Prevention and Control of Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae Infection in Swine: A Review. In: *Canadian Veterinary Journal* 29, S. 572–574.

Mackay, T.F.C (2001): The Genetic Architecture of Quantitative Traits. In: *Annual Review of Genetics* (35), S. 303–339..

Manly, K.F; Olson, J.F (1999): Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. In: *Mamm Genome* (10), S. 327–334.

Matheny, C. J.; Speck, M. E.; Cushing, P. R.; Zhou, Y.; Corpora, T.; Regan, M. et al. (2007): Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. In: *EMBO J* 26 (4), S. 1163–1175.

Mathews, S. T.; Rakhade, S.; Zhou, X.; Parker, G. C.; Coscina, D. V.; Grunberger, G. (2006): Fetuin-null mice are protected against obesity and insulin resistance associated with aging. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350 (2), S. 437–443.

Mathews, S. T.; Singh, G. P.; Ranalletta, M.; Cintron, V. J.; Qiang, X.; Scott Goustin, A. et al. (2002): Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. In: *Diabetes* 51 (8), S. 2450–2458.

Mauricio, R. (2001): Mapping quantitative trait loci in plants: Uses and caveats for evolutionary biology. In: *Nat Rev Genet* (2), S. 370–381.

McClure, M. C.; Ramey, H. R.; Rolf, M. M.; McKay, S. D.; Decker, J. E.; Chapple, R. H. et al. (2012): Genome-wide association analysis for quantitative trait loci influencing Warner-Bratzler shear force in five taurine cattle breeds. In: *Anim Genet* 43 (6), S. 662–673.

McElroy, J. P.; Dekkers J. C. M.; Fulton, J. E.; O'Sullivan, N. P.; Soller, M.; Lipkin, E. et al. (2005): Micosatellite Markers Associated with Resistance to Marek's Disease in Commercial Layer Chickens. In: *Poult Sci* (84), S. 1678–1688.

McEwen, Scott A.; Fedorka-Cray, Paula J. (2002): Antimicrobial use and resistance in animals. In: *Clin Infect Dis* 34 Suppl 3, S. 93-106.

McIntyre, K. W.; Shuster, D. J.; Gillooly, K. M.; Warrier, R. R.; Connaughton, S. E.; Hall, L. B. et al. (1996): Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. In: *Eur. J. Immunol.* 26 (12), S. 2933–2938.

Meeker, D. L.; Rothschild, M. F.; Christian, L. L.; Warner, C. M.; Hill, H. T. (1987): Genetic control of immune response to pseudorabies and atrophic rhinitis vaccines: I. Heterosis, general combining ability and relationship to growth and backfat. In: *J Anim Sci* 64 (2), S. 407–413.

Meijerink, E.; Fries, R.; Vögeli, P.; Masabanda J.; Wigger, G.; Stricker, C. et al. (1997): Two α(1,2) fucosyltransferase genes on porcine Chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. In: *Mammalian Genome* (8), S. 736–741.

Meijerink, E.; Neuenschwander, S.; Fries, R.; Dinter, A.; Bertschinger, H. U.; Stranzinger, G.; Vögeli, P. (2000): A DNA polymorphism influencing  $\alpha(1,2)$  fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to Escherichia coli F18 adhesion. In: *Immunogenetics* 52 (1-2), S. 129-136.

Meuwissen, T. H. E.; Hayes, B. J.; Goddard, M. E. (2001): Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. In: *Genetics* 157 (4), S. 1819–1829.

Mikhail, F. M.; Sinha, K. K.; Saunthararajah, Y.; Nucifora, G. (2006): Normal and transforming functions of RUNX1: A perspective. In: *J. Cell. Physiol.* 207 (3), S. 582–593.

Miles, C.M; Wayne, M. (2008): Quantitative Trait Locus (QTL) Analysis. In: *Nature Education* 1 (1)

Miyoshi, H.; Shimizu, K.; Kozu, T.; Maseki, N.; Kaneko, Y.; Ohki, M. (1991): t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (23), S. 10431–10434.

Morrison, D. F.; Foss, D. L.; Murtaugh, M. P. (2000): Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia. In: *Infect Immun* 68 (8), S. 4752–4758.

Morton, N. E. (2003): Genetic epidemiology, genetic maps and positional cloning. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358 (1438), S. 1701–1708.

Mugambi, J. M.; Bain, R. K.; Wanyangu, S. W.; Ihiga, M. A.; Duncan, J. L.; Murray, M.; Stear, M. J. (1997): Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial Haemonchus contortus infection. In: *Vet Parasitol* 69 (3-4), S. 265–273.

Müller, M.; Brem, G. (1991): Disease resistance in farm animals. In: *Experientia* 47 (9), S. 923-934.

Müllner, E. W.; Neupert, B.; Kühn, L. C. (1989): A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. In: *Cell* 58 (2), S. 373–382.

Murken, J.-D (2011): Humangenetik. 8. Aufl.: Georg Thieme Verlag, Rüdigerstraße 14, 70469 Stuttgart.

Murray, M.; Morrison, W.I; Whitelaw, D.D (1982): Host Susceptibility to African Trypanosomiasis: Trypanotoloerance. In: John R. Baker und Ralph Muller (Hg.): Advances in parasitology. London: Academic Press, S. 2–57.

#### N

Nadeau, J. H.; Sankoff, D. (1998): Counting on comparative maps. In: *Trends Genet* 14 (12), S. 495–501.

Narita, M.; Kawashima, K.; Matsuura, S.; Uchimura, A.; Miura, Y. (1994): Pneumonia in pigs infected with pseudorabies virus and haemophilus parasuis serovar 4. In: *Journal of Comparative Pathology* 110 (4), S. 329–339.

Nau Cornelissen, C.; Sparling, P. F. (1994): Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. In: *Molecular Microbiology* 14 (5), S. 843–850.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012a): AHSG. Online verfügbar unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ahsg%20and%20sus%20scrofa, zuletzt aktualisiert am 22.10.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012b): AHSG Protein. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/231467, zuletzt aktualisiert am 13.11.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014. NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012c): AHSG dbSNP. Online verfügbar unter

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=ahsg+and+sus+scrofa&SITE=NcbiHome&submit=G o, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012d): IL12A. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=il12a+and+sus+scrofa, zuletzt aktualisiert am 28.12.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012e): IL12A Protein. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\_999158.1, zuletzt aktualisiert am 28.04.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012f): IL12A dbSNP. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=397053&mrna=NM\_2 13993.1&ctg=NW\_003536025.2&prot=NP\_999158.1&orien=forward&refresh=refresh, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012g): MYD88. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/396646, zuletzt aktualisiert am 28.12.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012h): MYD88 Protein. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\_001093393.1, zuletzt aktualisiert am 13.04.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012i): MYD88 dbSNP. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=396646&mrna=NM\_0 01099923.1&ctg=NW\_003611610.1&prot=NP\_001093393.1&orien=forward&refresh=refres h, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012j): RUNX1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=runx1+and+sus+scrofa, zuletzt aktualisiert am 28.12.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012k): RUNX1 Protein. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\_001233181.1, zuletzt aktualisiert am 18.04.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014. NCBI (National Center for Biotechnology Information) (20121): RUNX1 dbSNP. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=100512633&mrna=X M\_003483355.1&ctg=NW\_003536138.2&prot=XP\_003483403.1&orien=reverse&refresh=re fresh, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012m): Transferrin. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/396996, zuletzt aktualisiert am 28.12.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012n): Transferrin Protein. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAQ34904.1, zuletzt aktualisiert am 17.07.2010, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012o): Transferrin dbSNP. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=396996&mrna=XM\_0 03483242.1&ctg=NW\_003611713.1&prot=XP\_003483290.1&orien=forward&refresh=refres h, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012p): Transferrin-Rezeptor. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=tfrc+and+sus+scrofa, zuletzt aktualisiert am 28.12.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012q): Transferrin-Rezeptor Protein. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\_999166.1, zuletzt aktualisiert am 18.04.2013, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2012r): Transferrin-Rezeptor dbSNP. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=397062&mrna=NM\_2 14001.1&ctg=NW\_003611790.1&prot=NP\_999166.1&orien=forward&refresh=refresh, zuletzt geprüft am 03.01.2014.

Nejsum, P.; Roepstorff, A.; Jorgensen, C. B.; Fredholm, M.; Goring, H. H. H.; Anderson, T. J. C.; Thamsborg, S. M. (2009): High heritability for Ascaris and Trichuris infection levels in pigs. In: *Heredity (Edinb)* 102 (4), S. 357–364.

Neurath, M. F.; Fuss, I.; Kelsall, B. L.; Stüber, E.; Strober, W. (1995): Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. In: *Journal of Experimental Medicine* 182 (5), S. 1281–1290.

Ng, P. C.; Henikoff, S. (2002): Accounting for Human Polymorphisms Predicted to Affect Protein Function. In: *Genome Research* 12 (3), S. 436–446.

Niederau, C. (2009): Die hereditäre Hämochromatose. In: Med Klin 104 (12), S. 931-946.

Niu, X.; Li, Y.; Ding, X.; Zhang, Q. (2011): Refined mapping of the Escherichia coli F4ab/F4ac receptor gene(s) on pig chromosome 13. In: *Animal Genetics* 42 (5), S. 552–555.

Noyes, H.; Brass, A.; Obara, I.; Anderson, S.; Archibald, A. L.; Bradley, D. G. et al. (2011): Genetic and expression analysis of cattle identifies candidate genes in pathways responding to Trypanosoma congolense infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (22), S. 9304–9309.

# 0

**O'**Brien, S. J. (1991): Mammalian genome mapping: lessons and prospects. In: *Current Opinion in Genetics & Development* 1 (1), S. 105–111.

Okuda, T.; Nishimura, M.; Nakao, M.; Fujita, Y. (2001): RUNX1/AML1: A central player in hematopoiesis. In: *International Journal of Hematology* (74), S. 252–257.

Okuda, T.; van Deursen, J.; Hiebert, S. W.; Grosveld, G.; Downing, J. R. (1996): AML1, the Target of Multiple Chromosomal Translocations in Human Leukemia, Is Essential for Normal Fetal Liver Hematopoiesis. In: *Cell* 84 (2), S. 321–330.

Opdam, F. J.; Echard, A.; Croes, H. J.; van den Hurk, J. A.; van de Vorstenbosch, R. A.; Ginsel, L. A. et al. (2000): The small GTPase Rab6B, a novel Rab6 subfamily member, is cell-type specifically expressed and localised to the Golgi apparatus. In: *J Cell Sci* 113 (Pt 15), S. 2725–2735.

Osato, M. (2004): Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. In: *Oncogene* 23 (24), S. 4284–4296.

Osawa, M.; Umetsu, K.; Sato, M.; Ohki, T.; Yukawa, N.; Suzuki, T.; Takeichi, S. (1997): Structure of the gene encoding human alpha 2-HS glycoprotein (AHSG). In: *Gene* 196 (1-2), S. 121–125.

## P

Pascu, C.; Costinar, L.; Herman, V.; Catana, N.; Serbescu, M.; Surpat, A. (2010): Monitoring of Antibiotic Resistance in Isolates of Actinobacillus pleuropneumoniae in the West Part of

Romania between 2005 and 2009. In: LUCRĂRI STIINIIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. XLIII. S. 173-176

Pateinakis, P.; Papagianni, A.; Douma, S.; Efstradiadis, G.; Memmos, D. (2013): Associations of fetuin-A and osteoprotegerin with arterial stiffness and early atherosclerosis in chronic hemodialysis patients. In: *BMC Nephrology* 14

Pedersen, K. O. (1944): Fetuin, a New Globulin Isolated from Serum. In: *Nature* (3914), S. 575.

Peng, Q.-L; Ren, J.; Yan, X.-M; Huang, X.; Tang, H.; Wang, Y.-Z et al. (2007): The g.243A>G mutation in intron 17 of MUC4 is significantly associated with susceptibility/resistance to ETEC F4ab/ac infection in pigs. In: *Animal Genetics* 38 (4), S. 397–400.

Perry, C.; Eldor, A.; Soreq, H. (2002): Runx1/AML1 in leukemia: disrupted association with diverse protein partners. In: *Leuk Res* 26 (3), S. 221–228.

Pintarič, M.; Gerner, W.; Saalmüller, A. (2008): Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-γ production of porcine natural killer cells. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121 (1-2), S. 68–82.

Podlaski, F. J.; Nanduri, V. B.; Hulmes, J. D.; Pan, Y.-C E.; Levin, W.; Danho, W. et al. (1992): Molecular characterization of interleukin 12. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294 (1), S. 230–237.

Pohl, S.; Bertschinger, H. U.; Frederiksen, W.; Mannheim, W. (1983): Transfer of Haemophilus pleuropneumoniae and the Pateurella haemolytica-Like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae comb. nov.) on the Basis of Phenotypic and Deoxyribonucleic Acid Relatedness. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 33 (3), S. 510–514.

Pohlmeier, B.; van Eenennaam, A. (2009): Potential effects of biotechnology on animal health and well-being. In: *Applications of Animal Biotechnology in Animal Health* S.1-5

Praslickova, D.; Sharif, S.; Sarson, A.; Abdul-Careem, M. F.; Zadworny, D.; Kulenkamp, A. et al. (2008): Association of a Marker in the Vitamin D Receptor Gene with Marek's Disease Resistance in Poultry. In: *Poultry Science* 87 (6), S. 1112–1119.

Preudhomme, C.; Warot-Loze, D.; Roumier, C.; Grardel-Duflos, N.; Garand, R.; Lai, J. L. et al. (2000): High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the

AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. In: *Blood* 96 (8), S. 2862–2869.

Probst, Inga (2009): Genetische Diversität und Disposition des Hausschweins zur Atemwegsinfektion. Hannover: Technische Informationsbibliothek u. Universitätsbibliothek.

Python, P.; Jörg, H.; Neuenschwander, S.; Asai-Coakwell, M.; Hagger, C.; Burgi, E. et al. (2005): Inheritance of the F4ab, F4ac and F4ad E. coli receptors in swine and examination of four candidate genes for F4acR. In: *J Anim Breed Genet* 122 Suppl 1, S. 5–14.

Python, P.; Jörg, H.; Neuenschwander, S.; Hagger, C.; Stricker, C.; Bürgi, E. et al. (2002): Fine-mapping of the intestinal receptor locus for enterotoxigenic Escherichia coli F4ac on porcine chromosome 13. In: *Animal Genetics* 33 (6), S. 441–447.

# Q

Qian, Z. M.; Li, H.; Sun, H.; Ho, K. (2002): Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. In: *Pharmacol Rev* 54 (4), S. 561–587.

# R

**Ra**mpoldi, Antonio; Jacobsen, Mette J.; Bertschinger, Hans U.; Joller, David; Bürgi, Esther; Vögeli, Peter et al. (2011): The receptor locus for Escherichia coli F4ab/F4ac in the pig maps distal to the MUC4–LMLN region. In: *Mamm Genome* 22 (1-2), S. 122–129.

Rao, K.; Harford, J. B.; Rouault, T.; McClelland, A.; Ruddle, F. H.; Klausner, R. D. (1986): Transcriptional Regulation by Iron of the Gene for the Transferrin Receptor. In: *Molecular and Cellular Biology* 6 (1), S. 236–240.

Rasch, B.; Hofmann, W.; Friese, M.; Naumann, E. (2010): Quantitative Methoden. Einführung in die Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).

Ratledge, C. (2007): Iron metabolism and infection. In: *Food & Nutrition Bulletin* 28 (4), S. 515-523

Reiner, G. (2006): Genetische Krankheitsresistenz beim Schwein. (Abstraktheft zum AfT Herbstsymposium). Akademie für Tiergesundheit e.V., Bonn. Oberschleißheim, 06.10.2006.

Reiner, G. (2008): Genetik und Krankheitsresistenz. In: *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 115 (7), S. 252–259.

Reiner, G.; Bertsch, N.; Hoeltig, D.; Selke, M.; Willems, H.; Gerlach, G. F. et al. (2014): Identification of QTL affecting resistance/susceptibility to acute Actinobacillus pleuropneumoniae infection in swine. In: *Mamm Genome*, S. 1-12.

Reiner, G.; Dreher, F.; Drungowski, M.; Bertsch, N.; Hoeltig, D.; Selke, M. et al.: Pathway regulators and expression QTL for the detection of candidate genes for resistance/susceptibility to Actinobacillus pleuropneumoniae in swine. (unveröffentlicht).

Reiner, G.; Eckert, J.; Peischl, T.; Bochert, S.; Jakel, T.; Mackenstedt, U. et al. (2002(a)): Variation in clinical and parasitological traits in Pietrain and Meishan pigs infected with Sarcocystis miescheriana. In: *Vet Parasitol* 106 (2), S. 99–113.

Reiner, G.; Hepp, S.; Hertrampf, B.; Kliemt, D.; Mackenstedt, U.; Daugschies, A.; Zahner, H. (2007a): Genetic resistance to Sarcocystis miescheriana in pigs following experimental infection. In: *Veterinary Parasitology* 145 (1-2), S. 2–10.

Reiner, G.; Kliemt, D.; Willems, H.; Berge, T.; Fischer, R.; Köhler, F. et al. (2007b): Mapping of quantitative trait loci affecting resistance/susceptibility to Sarcocystis miescheriana in swine. In: *Genomics* 89 (5), S. 638–646.

Reiner, G.; Melchinger, E.; Kramarova, M.; Pfaff, E.; Büttner, M.; Saalmüller, A.; Geldermann, H. (2002(b)): Detection of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to pseudorabies virus in swine. In: *Journal of General Virology* 83 (1), S. 167–172.

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. In: *Journal of Animal Breeding and Genetics* 127 (2), S. 100–106.

Remington, D. L.; Purugganan, M. D. (2003): Candidate Genes, Quantitative Trait Loci, and functional Trait Evolution in Plants. In: *Int. J. Plant Sci.* (164), S. 7–20.

Reynolds, J. L.; Skepper, J. N.; McNair, R.; Kasama, T.; Gupta, K.; Weissberg, P. et al.
(2005): Multifunctional Roles for Serum Protein Fetuin-A in Inhibition of Human Vascular
Smooth Muscle Cell Calcification. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 16 (10),
S. 2920–2930.

Robert Koch-Institut (RKI): Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten, Deutschland, 49. Woche 2012 (Datenstand: 26.12.2012).

Rodríguez, F.; Quesada, O.; Poveda, J.B; Fernández, A.; Lorenzo, H. (2007): Immunohistochemical Detection of Interleukin-12 and Interferon-γ in Pigs Experimentally Infected with Mycoplasma hyopneumoniae. In: *Journal of Comparative Pathology* 136 (1), S. 79–82.

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. In: *Genome Research* 6 (5), S. 371–391.

Ronaghi, M. (2001): Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. In: *Genome Res* 11 (1), S. 3–11.

Roy, B. A.; Kirchner, J. W. (2000): Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. In: *Evolution* 54 (1), S. 51–63.

Rutter, J.M; Burrows, M.R; Sellwood, R.; Gibbons, R.A (1975): A genetic basis for resistance to enteric disease caused by E.coli. In: *Nature* (257), S. 135–136.

### S

Saunders, N. R.; Sheardown, S. A.; Deal, A.; Mollgard, K.; Reader, M.; Dziegielewska, K. M. (1994): Expression and distribution of fetuin in the developing sheep fetus. In: *Histochemistry* (102), S. 457–475.

Sayers, G.; Good, B.; Hanrahan, J. P.; Ryan, M.; Angles, J. M.; Sweeney, T. (2005): Major Histocompatibility Complex DRB1 gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. In: *Parasitology* 131 (03), S. 403-409

Scanga, C. A.; Aliberti, J.; Jankovic, D.; Tilloy, F.; Bennouna, S.; Denkers, E. Y. et al. (2002): Cutting edge: MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. In: *J Immunol* 168 (12), S. 5997–6001.

Schadt, E. E.; Monks, S. A.; Drake, T. A.; Lusis, A. J.; Che, N.; Colinayo, V. et al. (2003): Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. In: *Nature* 422 (6929), S. 297–302.

Schaeffer, L. R. (2006): Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. In: *J. Anim. Breed. Genet.* (123), S. 218–223.

Schoder, G.; Maderbacher, R.; Wagner, G.; Baumgartner, W. (1993): Abgangsursachen in einem Schweinemastbetrieb. In: *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* (100), S. 428–432.

Schwartz, S. L.; Cao, C.; Pylypenko, O.; Rak, A.; Wandinger-Ness, A. (2007): Rab GTPases at a glance. In: *Journal of Cell Science* 120 (22), S. 3905–3910.

Schwerin, M.; Fries, R.; Simianer, H.; Swalve, H.; Wimmers, K. (2006): Die strukturelle und funktionelle Genomanalyse- neue Wege zum Verstehen des Phänotyps-Stand und Perspektiven. In: *Züchtungskunde* (78 (1)), S. 1–16.

Seaton, G.; Hernandez, J.; Grunchec, J.A; White, I.; Allen, J.; Koning, D. J. Wei W. de et al. (Hg.) (2006): GridQTL: A Grid Portal for QTL Mapping of Compute Intensive Datasets. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Belo Horizonte, MG, Brazil, 13.-18.08.

Sebunya, T.N.K; Saunders, J.R (1983): Haemophilus pleuropneumoniae infection in swine: A review. In: *J Am Vet Med Assoc* 182 (12), S. 1331–1336.

Seki, E.; Minicis, S. de; Österreicher, C. H.; Kluwe, J.; Osawa, Y.; Brenner, D. A.; Schwabe, R. F. (2007): TLR4 enhances TGF-β signaling and hepatic fibrosis. In: *Nat Med* 13 (11), S. 1324–1332.

Sellner, E. M.; Kim, J. W.; McClure, M. C.; Taylor, K. H.; Schnabel, R. D.; Taylor, J. F. (2007): Board-invited review: Applications of genomic information in livestock. In: *J Anim Sci* 85 (12), S. 3148–3158.

Sellwood, R.; Gibbons, R.A; Jones, G.W; Rutter, J.M (1975): Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to pig interstinal brush borders: The existance of two pig phenotypes. In: *J. Med. Micobiol.* (8), S. 405–411.

Shen, N.; Tsao, B.P (2004): Current advances in the human lupus genetics. In: *Current Rheumatology Reports* (6), S. 391–398.

Shinkai, H.; Suzuki, R.; Akiba, M.; Okumura, N.; Uenishi, H. (2011): Porcine Toll-like receptors: Recognition of Salmonella enterica serovar Choleraesuis and influence of polymorphisms. In: *Molecular Immunology* 48 (9-10), S. 1114–1120.

Simianer, H. (2009): The Potential of Genomic Selection to Improve Litter Size in Pig Breeding Programs. EAAP Euopean Federation of Animal Science, Annual Meeting. Barcelona.

Skallerup, P.; Nejsum, P.; Jørgensen, C. B.; Göring, H.H.H; Karlskov-Mortensen, P.; Archibald, A.L. et al. (2012): Detection of a quantitative trait locus associated with resistance to Ascaris suum infection in pigs. In: *International Journal for Parasitology* 42 (4), S. 383– 391. Slate, J. (2005): INVITED REVIEW: Quantitative trait locus mapping in natural populations: progress, caveats and future directions. In: *Molecular Ecology* 14 (2), S. 363–379.

Smith, J.; Sadeyen, J.-R; Paton, I. R.; Hocking, P. M.; Salmon, N.; Fife, M. et al. (2011): Systems Analysis of Immune Responses in Marek's Disease Virus-Infected Chickens Identifies a Gene Involved in Susceptibility and Highlights a Possible Novel Pathogenicity Mechanism. In: *Journal of Virology* 85 (21), S. 11146–11158.

Solano, G.I.; Segalés, J.; Collins, J.E.; Molitor, T.W.; Pijoan, C. (1997): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) interaction with Haemophilus parasuis. In: *Eradication of Aujeszky's Disease (Pseudorabies) Virus Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* 55 (1–4), S. 247–257.

Special Eurobarometer 270/ Wave 66.1 (2007): Attitudes of EU citizens towards animal welfare.

Srinivas, P. R.; Wagner, A. S.; Reddy, L. V.; Deutsch, D. D.; Leon, M. A.; Scott Goustin, A.; Grunberger, G. (1993): Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. In: *Molecular Endocrinology* 7 (11), S. 1445–1455.

Stear, M. J.; Boag, B.; Cattadori, I.; Murphy, L. (2009): Genetic variation in resistance to mixed, predominantly Teladorsagia circumcincta nematode infections of sheep: from heritabilities to gene identification. In: *Parasite Immunology* 31 (5), S. 274–282.

Stear, M. J.; Murray, M. (1994): Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. In: *Special Issue: 14th W.A.A.V.P. Conference* 54 (1–3), S. 161–176.

Stefan, N.; Hennige, A. M.; Staiger, H.; Machann, J.; Schick, F.; Krober, S. M. et al. (2006): Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. In: *Diabetes Care* 29 (4), S. 853–857.

Steppa, R.; Wojtowski, J.; Bielinska, S.; Keszycka, M. (2009): Effect of transferrin and haemoglobin polymorphism on hygienic quality of milk in sheep. In: *Züchtungskunde* 81 (2), S. 125–132.

Stratil, A.; Geldermann, H. (2004): Analysis of porcine candidate genes from selected QTL regions affecting product traits. In: *Animal Science Papers and Reports* 22 (1), S. 123–125.

Straw, B. E.; Tuovinen, V. K.; Bigras-Poulin, M. (1989): Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. In: *J Am Vet Med Assoc* 195 (12), S. 1702–1706.

Subramaniam, V. N.; Summerville, L.; Wallace, D. F. (2002): Molecular and cellular characterization of transferrin receptor 2. In: *Cell Biochem Biophys* 36 (2-3), S. 235–239.

Sun, G.; Schliekelman, P. (2011): A Genetical Genomics Approach to Genome Scans Increases Power for QTL Mapping. In: *Genetics* 187 (3), S. 939–953.

Sunyaev, S.; Ramensky, V.; Koch, I.; Lathe, W. 3rd; Kondrashov, A. S.; Bork, P. (2001): Prediction of deleterious human alleles. In: *Hum Mol Genet* 10 (6), S. 591–597.

Swallow, C. J.; Partridge, E. A.; Macmillan, J. C.; Tajirian, T.; DiGuglielmo, G. M.; Hay, K. et al. (2004): alpha2HS-glycoprotein, an antagonist of transforming growth factor beta in vivo, inhibits intestinal tumor progression. In: *Cancer Res* 64 (18), S. 6402–6409.

#### Т

Tabor, H. K.; Risch, N. J.; Myers, R. M. (2002): Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. In: *Nat Rev Genet* 3 (5), S. 391–397.

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. In: *International Immunology* 12 (1), S. 113–117.

Tanksley, S.D (1993): Mapping Polygenes. In: Annual Review of Genetics (27), S. 205-233.

Thaller, G. (2009): Genomische Selektion-Stand der Wissenschaft. In: *Züchtungskunde* 81 (1), S. 14–22.

Thompson, R.P (2009): History of Scientific Agriculture: Animals. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. S.1-6

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. In: *Cell Mol Immunol* 4 (5), S. 369–376.

Tokuhiro, S.; Yamada, R.; Chang, X.; Suzuki, A.; Kochi, Y.; Sawada, T. et al. (2003): An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. In: *Nat Genet* 35 (4), S. 341–348.

Tonpitak, W.; Baltes, N.; Hennig-Pauka, I.; Gerlach, G. F. (2002): Construction of an Actinobacillus pleuropneumoniae Serotype 2 Prototype Live Negative-Marker Vaccine. In: *Infection and Immunity* 70 (12), S. 7120–7125.

Tribout, T.; Larzul, C.; Phocas, F. (2012): Efficiency of genomic selection in a purebred pig male line. In: *Journal of Animal Science* 90 (12), S. 4164–4176.

Trinchieri, G. (1995): Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. In: *Annu. Rev. Immunol.* (13), S. 251–276.

Tripp, C. S.; Gately, M. K.; Hakimi, J.; Ling, P.; Unanue, E. R. (1994): Neutralization of IL-12 decreases resistance to Listeria in SCID and C.B-17 mice. Reversal by IFN-gamma. In: *The Journal of Immunology* 152 (4), S. 1883–1887.

Tschäpe, H.; Bockemühl J. (2002): Lebensmittelübertragene Salmonellose in Deutschland. In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 45 (6), S. 491–496.

#### U

Uddin, M. J.; Cinar, M. U.; Große-Brinkhaus, C.; Tesfaye, D.; Tholen, E.; Juengst, H. et al. (2011): Mapping quantitative trait loci for innate immune response in the pig. In: *International Journal of Immunogenetics* 38 (2), S. 121–131.

Uthe, J. J.; Bearson, S. M. D.; Qu, L.; Dekkers, J. C.; Nettleton, D.; Rodriguez Torres, Y. et al. (2011): Integrating comparative expression profiling data and association of SNPs with Salmonella shedding for improved food safety and porcine disease resistance. In: *Animal Genetics* 42 (5), S. 521–534.

## V

Vahle, J. L.; Haynes, J. S.; Andrews, J. J. (1995): Experimental Reproduction of Haemophilus Parasuis Infection in Swine: Clinical, Bacteriologic, and Morphologic Findings. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7 (4), S. 476–480.

Vaillancourt, J. P.; Higgins, R.; Martineau, G. P.; Mittal, K. R.; Larivière, S. (1988): Changes in the susceptibility of Actinobacillus pleuropneumoniae to antimicrobial agents in Quebec (1981-1986). In: *J Am Vet Med Assoc* 193 (4), S. 470-473.

Vallejo, R. L.; Bacon, L. D.; Liu, H. C.; Witter, R. L.; Groenen, M. A.; 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. In: *Genetics* 148 (1), S. 349–360.

van der Wolf, P. J.; Bongers, J. H.; Elbers, A. R. W.; Franssen, F. M. M. C.; Hunneman, W. A.; van Exsel, A. C. A.; Tielen, M. J. M. (1999): Salmonella infections in finishing pigs in

The Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. In: *Veterinary Microbiology* 67 (4), S. 263–275.

van Diemen, P. M.; Kreukniet, M. B.; Galina, L.; Bumstead, N.; Wallis, T. S. (2002): Characterisation of a resource population of pigs screened for resistance to salmonellosis. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 88 (3–4), S. 183–196.

van Eenennaam, A. (2008): DNA Markers: Explanation of Validation and Utilization. In: *American Red Angus Magazine*, S. 54–66.

van Laere, A.-S; Nguyen, M.; Braunschweig, M.; Nezer, C.; Collette, C.; Moreau, L. et al. (2003): A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. In: *Nature* 425 (6960), S. 832–836.

van Lieshout, M. H. P.; Blok, D. C.; Wieland, C. W.; Vos, A. F. de; van 't Veer, C.; van der Poll, T. (2012): Differential Roles of MyD88 and TRIF in Hematopoietic and Resident Cells During Murine Gram-Negative Pneumonia. In: *Journal of Infectious Diseases* 206 (9), S. 1415–1423.

van Oss, C. J.; Gillman, C. F.; Bronson, P. M.; Border, J. R. (1974): Opsonic Properties of Human Serum Alpha-2 HS Glycoprotein. In: *Immunological Communications* 3 (4), S. 329– 335.

van Raden, P.M; van Tassell, C.P; Wiggans, G.R; Sonstegard, T.S; Schnabel, R.D; Taylor, J.F; Schenkel, F.S (2009): Invited Review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. In: *Journal of Dairy Science* 92 (1), S. 16–24.

Vionnet, N.; Hani, El H.; Dupont, S.; Gallina, S.; Francke, S.; Dotte, S. et al. (2000): Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. In: *Am J Hum Genet* 67 (6), S. 1470–1480.

Visscher, P. M.; Thompson, R.; Haley, C. S. (1996): Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. In: *Genetics* 143 (2), S. 1013–1020.

Vögeli, P.; Bertschinger, H. U. (1999): Ödemkrankheit und Colidurchfall. In: *BioFokus* (53), S. 1–8.

Vögeli, P.; Meijerink, E.; Fries, R.; Neuenschwander, S.; Vorländer, N.; Stranzinger, G.; Bertschinger, H. U. (1997): A molecular test for the detection of E. coli F18 receptors: a

breakthrough in the struggle against edema disease and post-weaning diarrhea in swine]. In: *Schweiz Arch Tierheilkd* 139 (11), S. 479-484.

#### W

Wade, C. M.; Giulotto, E.; Sigurdsson, S.; Zoli, M.; Gnerre, S.; Imsland, F. et al. (2009): Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. In: *Science* 326 (5954), S. 865–867.

Wang, M.; Wang, Q.; Pan, Y.; Katoh, M. (2013): From QTL to QTN: Candidate Gene Set Approach and a Case Study in Porcine IGF1-FoxO Pathway. In: *PLoS ONE* 8 (1), e53452.

Wang, Y.; Ren, J.; Lan, L.; Yan, X.; Huang, X.; Peng, Q. et al. (2007): Characterization of polymorphisms of transferrin receptor and their association with susceptibility to ETEC F4ab/ac in pigs. In: *Journal of Animal Breeding and Genetics* 124 (4), S. 225–229.

Wayne, M. L.; McIntyre, L. M. (2002): Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (23), S. 14903–14906.

Weaver, M.; Laske, D. W. (2003): Transferrin Receptor Ligand-Targeted Toxin Conjugate (Tf-CRM107) for Therapy of Malignant Gliomas. In: *J Neurooncol* 65 (1), S. 3-14.

Weinberg, E. D. (1978): Iron and Infection. In: Microbiological Reviews 42 (1), S. 45-66.

Weller, J. I. (2009): Quantitative Trait Loci Analysis in Animals. 2. Aufl. Wallingford, UK: CABI.

Werts, C.; Tapping, R. I.; Mathison, J. C.; Chuang, T.-H; Kravchenko, V.; Saint Girons, I. et al. (2001): Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. In: *Nat. Immunol.* 2 (4), S. 346–352.

Wesche, H.; Henzel, W. J.; Shillinglaw, W.; Li, S.; Cao, Z. (1997): MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. In: *Immunity* 7 (6), S. 837–847.

West, A. P., JR; Bennett, M. J.; Sellers, V. M.; Andrews, N. C.; Enns, C. A.; Bjorkman, P. J. (2000): Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. In: *J Biol Chem* 275 (49), S. 38135–38138.

Wilkinson, J. M.; Sargent, C.A; Galina-Pantoja, L.; Tucker, A.W (2010): Gene expression profiling in the lungs of pigs with different susceptibilities to Glässers disease. In: *BMC Genomics* 11:455

Willyard, C. (2011): Putting sleeping sickness to bed. In: Nat Med 17 (1), S. 14-17.

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. In: *International Journal of Immunogenetics* 35 (1), S. 75–85.

Winter, G. W.; Schreck, C. B.; McIntyre, J. D. (1980): Resistance of different stocks and transferrin genotypes of Coho Salmon, Oncorhynchus kisutch, and Steelhead Trout, Salmo gardneri, to Bacterial Kidney Disease and Vibriosis. In: *Fishery Bulletin* 77 (4), S. 795–802.

Witter, R. L. (1998): Control strategies for Marek's disease: a perspective for the future. In: *Poult Sci* 77 (8), S. 1197–1203.

Wolf, E. (2005): Nutztiere-quo vadite? Neue Wege durch funktionale Genomanalyse. FUGATO. Online verfügbar unter www.fugato-

 $for schung. de/services/files/pdf/nutztiere\_wolf\_neu.$ 

Wong, W. F.; Kohu, K.; Chiba, T.; Sato, T.; Satake, M. (2011): Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx. In: *Immunology* 132 (2), S. 157–164.

Wu, C. Y.; Demeure, C.; Kiniwa, M.; Gately, M.; Delespesse, G. (1993): IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. In: *The Journal of Immunology* 151 (4), S. 1938–1949.

Würschum, T. (2012): Mapping QTL for agronomic traits in breeding populations. In: *Theor Appl Genet* 125 (2), S. 201–210.

## Х

Xu, S. (2003): Theoretical basis of the Beavis effect. In: Genetics 165 (4), S. 2259–2268.

## Y

Yamada, R.; Ymamoto, K. (2005): Recent findings on genes associated with inflammatory disease. In: *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs): Detection, Interpretation, and Applications* 573 (1–2), S. 136–151.
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. In: *Animal Genetics* (30), S. 126–135.

Yu, Jiang; Wu, Jiaqiang; Zhang, Yuyu; Guo, Lihui; Cong, Xiaoyan; Du, Yijun et al. (2012): Concurrent highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection accelerates Haemophilus parasuis infection in conventional pigs. In: *Veterinary Microbiology* 158 (3-4), S. 316–321.

## Ζ

Zeng, Z.-B (1994): Precision mapping of quantitative trait loci. In: *Genetics* 136 (4), S. 1457–1468.

Zeng, Z.-B (2005): QTL mapping and the genetic basis of adaptation: recent developments. In: *Genetica* (123), S. 25–37.

Zhang, L.; Lukasik, S. M.; Speck, N. A.; Bushweller, J. H. (2003): Structural and functional characterization of Runx1, CBFβ, and CBFβ-SMMHC. In: *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 30 (2), S. 147–156.

Zhu, M.; Zhao, S. (2007): Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges. In: *Int. J. Biol. Sci.*, S. 420–427.

Zimmerman, J. J. Karriker L. A.; Ramirez, A.; Schwartz, K.J; Stevenson, G.W (Hg.) (2012): Diseases of swine. 10. Aufl. Chichester, West Sussex, Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

## <u>Danksagung</u>

Herrn Prof. Dr. Dr. Reiner danke ich für die Überlassung des Themas und die umfassende Betreuung hinsichtlich sämtlicher Themenbereiche.

Besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Willems, da er mit seiner geduldigen, freundlichen Art ein unverzichtbarer Helfer in allen Phasen dieser Arbeit war.

Dem Laborteam danke ich für allerlei praktische Tipps und Hilfen, es war sehr angenehm mit euch zu arbeiten!

Meiner Familie danke ich für ihre mentale, praktische und nicht zuletzt finanzielle Unterstützung, mit der sie dieses Unternehmen überhaupt erst möglich gemacht haben.

Julia Rudd danke ich für unsere langjährige Freundschaft und im Besonderen für ihre Nachhilfe in Übersetzungsfragen.

Sabine Thäle danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist.









Photo cover: © Eric Isselée - fotolia.de