

Nadine Désirée Zeller

---

Untersuchung der Gene von Erythropoetin und  
Erythropoetin-Rezeptor als Kandidatengene  
für die Variabilität in der Erythropoese  
beim Schwein

Inaugural-Dissertation 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 dem Autor dieses Werkes.**

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

1. Auflage 2017

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 Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition linguistique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

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

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

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine  
Professur für Schweinekrankheiten  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

**Untersuchung der Gene von Erythropoetin und Erythropoetin-  
Rezeptor als Kandidatengene für die Variabilität in der  
Erythropoese beim Schwein**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Nadine Désirée Zeller**

Tierärztin aus Nürtingen

Gießen, 2017

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

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

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Prof. Dr. A. Moritz

Tag der Disputation:

10.01.2017

**Meiner Familie**



---

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VI
Schemataverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung .....	1
2 Literaturübersicht .....	3
2.1 Anämie beim Schwein .....	3
2.1.1 Definition Anämie .....	3
2.1.2 Diagnostik der Anämie beim Schwein .....	3
2.1.3 Erythropoese .....	4
2.1.4 Ursachen von Anämien beim Schwein .....	6
2.1.4.1 <i>Sarcocystis miescheriana</i> .....	9
2.1.5 Pathogenese der Eisenmangelanämie und der Anämie als Begleiterscheinung von chronischen Erkrankungen .....	12
2.1.5.1 Eisenmangelanämie .....	12
2.1.5.2 Anämie chronischer Erkrankungen .....	13
2.2 Variationen im roten Blutbild beim Schwein .....	14
2.2.1 Rasseunterschiede .....	14
2.2.2 Genetische Unterschiede .....	15
2.2.2.1 Genvarianten für Parameter des roten Blutbilds beim Schwein .....	15
2.2.2.1.1 KIT als Kandidatengen für die Blutbildung beim Schwein .....	16
2.2.2.2 Genvarianten für Parameter des roten Blutbilds bei anderen Nutztieren ...	17
2.2.3 QTL-Analyse .....	18
2.3 Genetische Krankheitsresistenz beim Schwein .....	19
2.3.1 Resistenzunterschiede gegenüber <i>S. miescheriana</i> beim Schwein .....	21
2.4 Erythropoetin .....	22
2.4.1 Aufbau und Funktion .....	22
2.4.2 Das Erythropoetin Gen .....	24
2.4.2.1 Aufbau .....	24
2.4.2.2 Regulation der Erythropoetin-Genexpression .....	25
2.4.2.3 Hypoxie-induzierbare Faktoren und ihre Beteiligung an der Transkriptionsrate von Epo .....	28

---

2.4.2.3.1	HIF .....	28
2.4.2.3.1	HNF-4 .....	29
2.4.2.3.2	p300/CBP .....	30
2.4.2.4	Genetische Variabilität im EPO-Gen des Schweins .....	31
2.5	Erythropoetin-Rezeptor .....	32
2.5.1	Aufbau des Rezeptors .....	32
2.5.2	Signaltransduktion .....	33
2.5.2.1	Janus-Kinase-STAT-Signalweg .....	33
2.5.2.2	Phosphatidyinositol-3-Kinase Signalweg .....	33
2.5.2.3	MAP-Kinase-Signalweg .....	34
2.5.2.4	Intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Einstrom .....	35
2.5.3	Das Erythropoetin-Rezeptor Gen .....	35
2.5.3.1	Aufbau .....	35
2.5.3.2	Regulation der Genexpression .....	36
2.5.3.3	Transkriptionsfaktoren mit Beteiligung an der Transkription von EPOR .....	38
2.5.3.3.1	GATA-Transkriptionsfaktoren .....	38
2.5.3.3.2	Sp1 .....	39
2.5.3.3.3	SCL/TAL1 .....	40
2.5.3.4	Genetische Variabilität im EPOR-Gen beim Schwein .....	41
3	Material und Methoden .....	42
3.1	Versuchstiere .....	42
3.1.1	F2-Schweinepopulation .....	42
3.1.2	Kommerzielle Schweinepopulation .....	43
3.2	Material .....	44
3.2.1	Geräte und Labormaterial .....	44
3.2.2	Chemikalien und Enzyme .....	45
3.2.3	Lösungen und Puffer .....	46
3.2.4	Computerprogramme .....	47
3.2.5	Internetadressen der verwendeten Datenbanken .....	47
3.3	Methoden .....	48
3.3.1	Datenbankrecherche .....	48
3.3.2	Primerdesign .....	48
3.3.3	Konzentrationsbestimmung der Primer mittels Photometrie .....	51
3.3.4	Probenmaterial .....	51

---

3.3.4.1	DNA-Extraktion.....	51
3.3.4.2	Whole Genome Amplification.....	52
3.3.5	Amplifikation spezifischer EPO und EPO-Rezeptor-Sequenzen .....	53
3.3.5.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	53
3.3.6	Agarosegelelektrophorese.....	55
3.3.7	Vorbereitung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung .....	55
3.3.8	Sequenzierung der F0-Tiere.....	55
3.3.9	Identifizierung von SNPs.....	55
3.3.10	Identifikation der Genotypen in der F1-Generation.....	56
3.3.11	Identifikation der Genotypen in der F2-Generation und der kommerziellen Population .....	56
3.3.12	Primerdesign für die Pyrosequenzierung.....	56
3.3.13	PCR-Amplifikation für die Pyrosequenzierung .....	58
3.3.14	Pyrosequenzierung .....	58
3.4	Phänotypen.....	60
3.4.1	Blutentnahme .....	60
3.4.2	Anfertigung eines Differenzialblutbildes .....	60
3.4.3	Statistische Auswertung .....	60
3.4.4	QTL-Analyse .....	61
4	Ergebnisse .....	62
4.1	EPO.....	62
4.1.1	Gensequenz EPO.....	62
4.1.2	Alignment der Sequenzen von EPO.....	62
4.1.3	Genotypen.....	68
4.1.4	Darstellung der SNPs in EPO .....	70
4.1.5	Aminosäuresequenz von EPO.....	73
4.2	EPOR.....	74
4.2.1	Gensequenz EPOR .....	74
4.2.2	Alignment der Sequenzen von EPOR .....	74
4.2.3	Darstellung der SNPs in EPOR.....	76
4.3	Auswahl der SNPs für weitere Untersuchungen.....	78
4.4	Genotypen und Allelfrequenzen in der F2-Generation .....	78
4.5	Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp in der F2-Generation.....	79
4.6	Kartierung von EPOR auf SSC 2 und Erythropoetin auf SSC3 .....	87

---

4.7	QTL-Analyse .....	87
4.8	Auswahl der SNPs für die kommerzielle Population.....	92
4.9	Genotypen der kommerziellen Population .....	92
4.10	Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp in der kommerziellen Population unter Einbeziehung von SNP ERE7.....	93
5	Diskussion.....	95
5.1	Bedeutung der genetischen Krankheitsresistenz für die Nutztierzucht.....	95
5.2	Die molekulare Basis der Genregulierung in der Erythropoese .....	96
5.3	Bekannte genetische Variationen mit Einfluss auf die Blutbildung .....	98
5.4	Variabilität von EPO und EPOR des Schweins im Vergleich mit anderen Tierarten und dem Menschen.....	100
5.5	Vergleich der Variabilität von EPOR mit bekannten Genvarianten mit Einfluss auf Reproduktionsparameter beim Schwein.....	102
5.6	Methodik.....	103
5.7	Folgen der gewonnenen Erkenntnisse .....	104
6	Zusammenfassung .....	106
7	Summary .....	108
8	Literaturverzeichnis .....	109
9	Anhang .....	132

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schnittstellen der Wirkung von EPO während der Hämatopoese .....	5
Abb. 2	Entwicklungszyklus von <i>S. miescheriana</i> .....	10
Abb. 3	Erythropoetin (Bändermodell) .....	22
Abb. 4	Schematische Darstellung des Erythropoetin-Gens .....	28
Abb. 5	Schematische Darstellung der Bindungsstellen von Hypoxie-induzierten Faktoren .....	30
Abb. 6	Extrazelluläre Domäne des Epo-Rezeptor mit gebundenem Epo .....	32
Abb. 7	Janus-Kinase-STAT-Signalweg .....	34
Abb. 8	Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg .....	34
Abb. 9	Allgemeine schematische Darstellung des Epo-Rezeptor Gens .....	37
Abb. 10	Schematische Darstellung der SNPs in EPO .....	72
Abb. 11	Graphische Darstellung der SNPs in EPOR .....	77
Abb. 12	Assoziation zwischen ERE7 und Erythrozytenzahl .....	80
Abb. 13	Signifikante Assoziationen zwischen SNPs und Hämatokrit .....	85
Abb. 14	Signifikante Assoziationen zwischen SNPs und Hämoglobingehalt .....	85
Abb. 15	Signifikante Assoziationen zwischen SNPs und Erythrozytenzahl .....	86
Abb. 16	Signifikante Assoziationen zwischen SNPs und MCHC .....	86
Abb. 17	QTL für Hämatokrit, Hämoglobin, RBC und MCHC auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung von SNP ERE7 an Tag 0 .....	90
Abb. 18	QTL für Hämatokrit, Hämoglobin, RBC und MCHC auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung von SNP ERE7 an Tag 14 .....	90
Abb. 19	QTL für Hämatokrit, Hämoglobin, RBC und MCHC auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung von ERE7 an Tag 28 .....	91
Abb. 20	QTL für Hämatokrit, Hämoglobin, RBC und MCHC auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung von ERE7 an Tag 42 .....	91
Abb. 21	Mittelwerte und Standardabweichung für die Retikulozytenzahl innerhalb der Genotypen von ERE7 in der kommerziellen Population .....	94

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Referenzwerte des roten Blutbildes beim Schwein.....	4
Tabelle 2	Referenzwerte der verschiedenen Schweinerassen.....	14
Tabelle 3	Tierzahlen und Aufbau der F <sub>2</sub> -Familie.....	43
Tabelle 4	PCR-Primer EPO-Gen.....	49
Tabelle 5	PCR-Primer EPOR-Gen .....	50
Tabelle 6	Zusammensetzung eines 30 µl PCR-Reaktionsansatzes .....	54
Tabelle 7	Zusammensetzung eines 30 µl PCR-Reaktionsansatzes mit Q-Solution ....	54
Tabelle 8	PCR-Programm.....	54
Tabelle 9	Sequenzierungsprimer für SNPs in EPO.....	57
Tabelle 10	Sequenzierungsprimer für SNPs in EPOR .....	58
Tabelle 11	Exon-Intron-Grenzen von EPO.....	62
Tabelle 12	Genotypen der F0-Generation bei SNPs von EPO .....	68
Tabelle 13	Genotypen der F1-Generation.....	69
Tabelle 14	Basenaustausch .....	71
Tabelle 15	Exon-Intron-Grenzen von EpoRezeptor-Gen .....	74
Tabelle 16	Basenaustausch .....	76
Tabelle 17	Genotypen der F0-Generation bei SNPs von EPOR.....	76
Tabelle 18	Genotypen und Allelfrequenzen der F2-Generation .....	79
Tabelle 19	Assoziation zwischen SNP und Hämatokrit .....	81
Tabelle 20	Assoziation zwischen SNP und Hämoglobingehalt .....	82
Tabelle 21	Assoziation zwischen SNP und Erythrozytengehalt .....	83
Tabelle 22	Assoziation zwischen SNP und MCHC .....	84
Tabelle 23	F-Wert Änderung durch ERE7 auf SSC2.....	88
Tabelle 24	F-Wert Änderung durch SNPs auf SSC3 .....	89
Tabelle 25	Genotypen und Allelfrequenzen (in %) in der kommerziellen Population für SNPs EE11_2, EE2, ERE1, und ERE7 .....	93
Tabelle 26	Veränderungen der Mittelwerte der Parameter des roten Blutbildes unter Berücksichtigung der Genotypen für SNP ERE7 in der kommerziellen Population und im Vergleich zu Normwerten beim Schwein .....	94

---

## Schemataverzeichnis

Schema 1	Alignment der Sequenzen der F0-Tiere von EPO.....	63
Schema 2	Alignement der F0-Tiere des EpoPromtors.....	64
Schema 3	Aminosäuresequenz von EPO.....	73
Schema 4	Alignment der F0-Tiere von EPOR .....	75
Schema 5	Aminosäuresequenz von EPOR.....	77

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
APP	Actinobacillus pleuropneumoniae
Apx	Actinobacillus pluropneumoniae – RTX - Toxin
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaar
BFU-E	Burst Forming Unit Erythroid
C	Cytosin
Ca	Kalzium
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	cAMP-response-element-binding-protein
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CHr	Hämoglobingehalt der Erythrozyten
Chr.	Chromosom
CHCM	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (Copuscular Hemoglobin Concentration Mean)
CFU-E	Colony Forming Unit Erythroid
cM	centimorgan
Cys	Cystein
d.h.	das heißt
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKLF	erythroid Krüppel-like factor
Epo	Erythropoetin
EPO	Erythropoetin-Gen
EpoR	Erythropoetin-Rezeptor

---

EPOR	Erythropoetin-Rezeptor-Gen
ESBL	Extended- spectrum Beta- Laktamase
Fe	Eisen
fmol	Femtomol
FOG	Friend of GATA
fl	Femtoliter
F1	1. Filialgeneration
F2	2. Filialgeneration
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
HAF	Hypoxie-assoziiertes Faktor
Hb	Hämoglobin
HGB	Hämoglobin
HDW	Hämoglobinverteilungsbreite (Haemoglobin Distribution Width)
HIF	Hypoxia Inducible Element
HIS	Histidin
Hk	Hämatokrit
HLH	Helix-Loop-Helix
HNF	Hepatic Nuclear Factor
HRE	Hypoxia-responsive Element
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRE	Iron Regulatory Element
IRP	Iron Regulatory Protein
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kBp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KIE	Kidney Inducibility Element
l	Liter
LIE	Liver Inducibility Element
M	molare Masse

---

mA	Milliampere
MAP	mitogen-activated protein
MCH	Mittlerer zellulärer Hämoglobingehalt (Mean Corpuscular Hemoglobin)
MCHC	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)
MCV	Mittleres Erythrozytenvolumen (Mean Corpuscular Volume)
MDA	Multiple Displacement Amplification
min.	Minute
mind.	mindestens
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MMA-Komplex	Mastitis-Metritis-Agalaktie-Komplex
mmol	Millimol
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen (Mean Platelet Volume)
mRNA	messenger RNA
NRE	Negative Regulatory Element
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NE	Nekrotisierende Enteritis
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Porcines Circovirus
PDNS	Porcines Dermatitis und Nephropathie Syndrom
pg	Picogramm
PHE	Porcine Hämorrhagische Enteropathie
PI	Phosphatidylinositol
p.i.	post infectionem
PIA	Porcine Intestinale Adenomatose
PLT	Thrombozytenzahl (Platelet Count)
PMWS	Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrom
PPE	Porcine Proliferative Enteritis

---

PRRSV	Porcines Reproduktives- und Respiratorisches Syndrom-Virus
QTL	Quantitative Trait Loci
QTN	Quantitative Trait Nucleotide
RAS	Rat Sarcoma
RAF	Rat Fibrosarcoma
RBC	Red Blood Cells
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite (Red Blood Cell Distribution Width)
Retic	Retikulozytenzahl
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RTX	Repeats in Toxin
SCF	Stem Cell Factor
SCL	Stem Cell Leukemia
sek	Sekunde
Ser	Serin
S.	Sarcocystis
SNP	Single Nucleotide Polymorphismus
Sp1	spezifisches Protein 1
spp.	species pluralis
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SV	Simian Virus
T	Thymin
T/l	Tera/Liter
Tab.	Tabelle
TAL1	T-Cell acute lymphocytic leukemia protein 1
TE	Tris EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan
Trp	Tryptophan
UTR	untranslated region
V	Volt
V.	Vena
v.a.	vor allem

---

W	Watt
WBC	Leukozytenzahl (Total Leukocyte Count)
WGA	Whole Genome Amplification
www	world wide web
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# 1 Einleitung

In der Nutztierhaltung besteht durch die meist hohe Besatzdichte und dem damit verbundenen hohen Infektionsdruck permanent die Gefahr eines Krankheitsausbruchs. Tierverluste und teure Behandlungs- und Medikamentenkosten verursachen hohe Ausgaben bei den Landwirten. Gleichzeitig führen eine reduzierte Futtermittelverwertung und die Leistungsminderung erkrankter Tiere zu einem erhöhten finanziellen Aufwand und damit zu weiteren finanziellen Einbußen. Auf Seiten der Tiere kommt es hervorgerufen durch die Krankheitssymptome zu einem erhöhten Leidensdruck, welcher auch unter dem Aspekt des Tierschutzes relevant ist.

Bei Schweinen treten oftmals Anämien auf, die entweder primäres Krankheitssymptom sein können oder mit anderen Krankheitssymptomen assoziiert sind. Ferkel entwickeln in Intensivhaltung häufig eine Eisenmangelanämie, welcher mit speziellen Eisenpräparaten vorgebeugt werden muss. Auch hämorrhagische Erkrankungen, insbesondere des Verdauungs- und Respirationstrakts sowie starker Parasitenbefall können zur Anämie führen. Chronische Allgemeinerkrankungen bewirken über die Ausschüttung von Zytokinen eine verminderte Erythropoese.

Anhand des roten Blutbildes beurteilt der Tierarzt Art und Grad der Anämie und gewinnt wertvolle Hinweise über deren Ursache. Dabei müssen auch bei gesunden Tieren genetische Unterschiede berücksichtigt werden. Kixmüller et al. (2004) konnten zeigen, dass für verschiedene Parameter des roten Blutbildes bei gesunden Schweinen unterschiedlicher Rassen verschiedene Referenzwerte angenommen werden müssen. Aber auch im Hinblick auf den Schweregrad einer Anämie scheint es rasseabhängige Divergenzen zu geben. Vorversuche zu der hier vorliegenden Arbeit zeigten, dass Tiere der Rasse Meishan nach Infektion mit dem Erreger *S. miescheriana* deutlich geringere Abweichungen im roten Blutbild aufwiesen als die Vergleichsgruppe von Pietrain-Schweinen.

In der Schweinezucht sind bis heute nur wenige Marker im Zusammenhang mit Krankheitsresistenz etabliert. Dabei ist es sowohl unter dem ökonomischen Aspekt als auch aus Sicht der Verbraucher und des Tierschutzes nötig, die Möglichkeiten der Selektion auf resistenz-assoziierte Merkmale voranzutreiben. Aufgrund des Einsatzes von Medikamenten gerät die Nutztierhaltung immer wieder in den Fokus von Presse, Gesellschaft und Politik.

---

Der Verbraucher wünscht Lebensmittel von „gesunden und tiergerecht gehaltenen“ Tieren. Die Freiheit des Fleisches von pathogenen Keimen und Rückständen bestimmt mehr und mehr die Akzeptanz der Verbraucher. Um den Einsatz von Medikamenten in der Tiermedizin senken zu können, wird neben der Verbesserung der Haltungsbedingungen auch die Zucht von krankheitsresistenten Nutztieren als Option angesehen. Die meisten bisher etablierten Marker assoziieren jedoch hauptsächlich mit Produktionsmerkmalen. Für Merkmale der Krankheitsresistenz sind bisher nur wenige Marker bekannt. Versuche von Reiner et al. (2007) im Zusammenhang mit einer experimentellen Infektion mit *S. miescheriana* bei Schweinen der Rassen Pietrain und Meishan konnten mehrere QTL identifizieren, die im Zusammenhang mit der Blutbildung stehen. Gleichzeitig wurden die Gene EPO und EPOR als Kandidatengene für die Blutbildung bestimmt.

Die hier vorliegende Arbeit soll nun einen Beitrag zur Detektion von genetischen Markern im Hinblick auf die Resistenzen gegenüber Anämien beim Schwein leisten und die von Reiner et al. gefundenen QTL näher eingrenzen.

Im Einzelnen sollen folgende Ziele verfolgt werden:

1. Die molekulare Charakterisierung des Erythropoetin-Gens (EPO) und des Erythropoetinrezeptor-Gens (EPOR) beim Schwein im Hinblick auf die Variabilität im roten Blutbild.
2. Die Eingrenzung von QTLs für die Variabilität im roten Blutbild unter Berücksichtigung von EPO und EPOR als Kandidatengene

---

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Anämie beim Schwein

#### 2.1.1 Definition Anämie

Unter einer Anämie versteht man die Verminderung der Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration und / oder des Hämatokrits (Pschyrembel 2002). Anämien können bei einem übermäßigen Blutverlust, bei einer verminderten Erythropoese oder aufgrund eines verstärkten Abbaus von Erythrozyten (hämolytische Anämie) entstehen. Des Weiteren lassen sie sich in regenerative und hypoplastische Anämien einteilen. Bei regenerativen Anämien kommt es zu einem Verlust der reifen Erythrozyten; die Erythropoese durch die Vorläuferzellen im Knochenmark ist jedoch nicht gestört. Sie wird durch das Vorkommen einer vermehrten Zahl von Retikulozyten im peripheren Blut charakterisiert. Bei einer hypoplastischen Anämie ist bereits die Bildung der Erythrozyten im Knochenmark beeinträchtigt, so dass eine verminderte Zahl an roten Blutzellen heranreift. Eine Anämie kann akut oder chronisch auftreten.

#### 2.1.2 Diagnostik der Anämie beim Schwein

Bei dem Verdacht auf eine Anämie bei einem oder mehreren Schweinen eines Bestandes, ist die Blutuntersuchung, insbesondere die Untersuchung des roten Blutbildes das wichtigste Diagnostikum. Anhand der ermittelten Werte kann nicht nur die Schwere einer Anämie abgeschätzt werden, sondern diese auch charakterisiert werden. Evtl. können sogar erste Hinweise auf die Ursache der Anämie gewonnen werden. Wichtige Parameter sind die Gesamterthrozytenzahl, der Hämatokrit, der Hämoglobingehalt und die Erythrozytenindizes MCH, MCHC und MCV. Die Blutentnahme erfolgt beim Schwein aus der V. jugularis, bei sehr jungen Tieren auch aus der V. cava cranialis.

**Tabelle 1 Referenzwerte des roten Blutbildes beim Schwein**

Erythrozytenzahl	5,8 - 8,1 T/l
Hk	0,33 – 0,45 l/l
Hb	6,7 – 9,2 mmol/l
MCHC	19 – 22 mmol/l
MCH	1,0 – 1.3 fmol
MCV	50 -65 fl

(Kraft und Dürr 2013)

### 2.1.3 Erythropoese

Die mittlere Lebenszeit eines Erythrozyten beträgt ca. 120 Tage. In regelmäßigen Abständen, oder auch vermehrt nach einem größeren Blutverlust, werden neue Erythrozyten nachgebildet, um einen adäquaten Sauerstofftransport ins Gewebe zu gewährleisten. Die Bildung der Erythrozyten erfolgt bei adulten Säugetieren im Knochenmark. Bei Embryonen findet sie zuerst im Dottersack, ab Mitte der Embryonalzeit hauptsächlich in der fetalen Leber und zu einem kleineren Teil auch in der Milz statt. Die Verlagerung der Erythropoese in das Knochenmark erfolgt im letzten Trächtigkeitsdrittel (Schnorr und Kressin 2011).

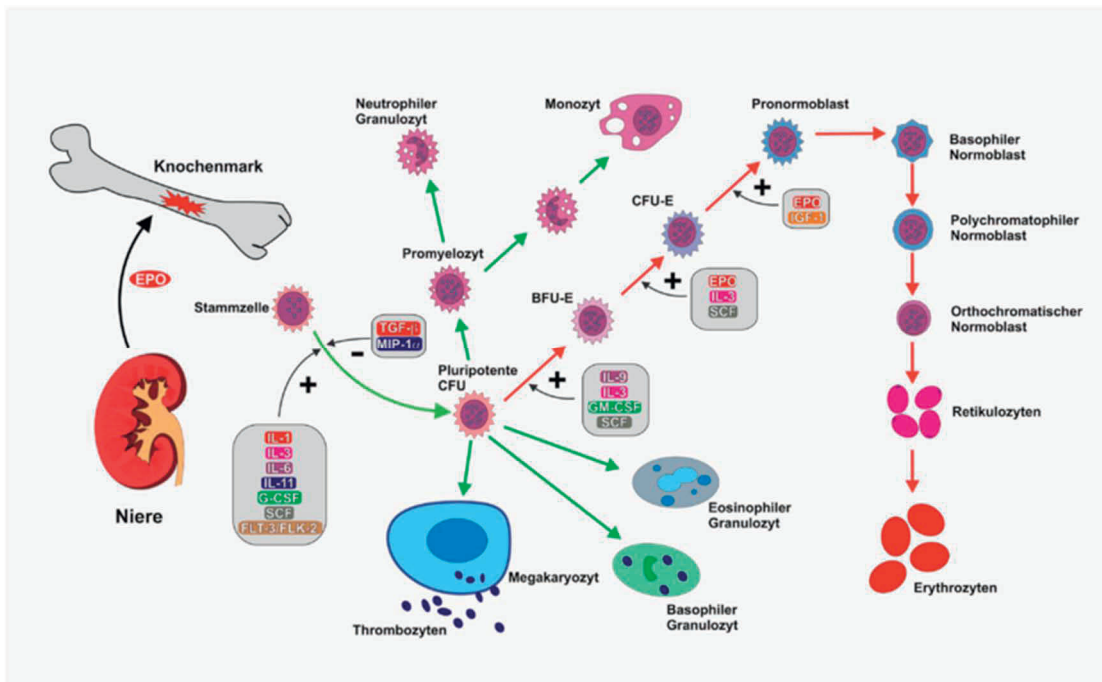
Die Bildung der Erythrozyten erfolgt aus einem pluripotenten Stammzellpool. Diese Stammzellen sind nicht teilungsfähig, sondern können sich entweder zu determinierten lymphoiden Vorläuferzellen, aus denen die Lymphozyten hervorgehen, oder zu nichtdeterminierten Stammzellen der anderen Blutzellen differenzieren (Abramson 1977). Diese nichtdeterminierten Stammzellen reifen weiter und werden zu determinierten myeloiden Vorläuferzellen. Daraus entstehen zu ca. 75 % Erythrozyten und zu ca. 25 % Leukozyten (Schartl und Arand 2009).

Vorläuferzellen, die zu Erythrozyten heranreifen sollen, differenzieren sich über das Stadium der BFU-E (burst forming unit erythroid) und CFU-E (colony forming unit erythroid) zu Proerythroblasten. Unter den BFU-E unterscheidet man zwischen zwei Subtypen: Einer dieser Subtypen produziert in relativ kurzer Zeit (3 Tage bei der Maus, 8-10 Tage beim Menschen) eine geringe Anzahl an Erythroblasten; der andere Subtyp braucht für die Produktion von Erythroblasten länger, produziert aber mehrere hundert dieser Zellen (Gregory 1976), (Gregory und Eaves 1977).

BFU-E Zellen sind vor allem vom Wachstumsfaktor Interleukin-3 abhängig; Epo spielt dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Für die Aktivierung der BFU-E vom langsamen Typ wird im Gegensatz zur Aktivierung von CFU-E, die mehr als 100-fache Konzentration von Epo benötigt. Die Aktivierung der BFU-E vom schnellen Typ erfordert eine vierfach höhere Epo-Konzentration als zur Aktivierung des langsamen Typs (Gregory 1976).

Die noch weiter entwickelten CFU-E sind entscheidend von Epo als Wachstumsfaktor abhängig. Die Anzahl der gebildeten CFU-E-Kolonien korreliert mit der Epo-Konzentration (McLeod et al. 1974). Diese Zellen haben ihre Befähigung zur Zellteilung verloren, sind jedoch in der Lage sich weiter zu differenzieren. Aus einem Cluster können so zwischen 8 und 60 Erythroblasten hervorgehen (Stephenson et al. 1971). Umemura et al. (1989) konnten beweisen, dass gerade das Zusammenspiel von Epo und IL-3, im Gegensatz zur Anwesenheit eines einzelnen dieser Wachstumsfaktoren, zur Bildung der größtmöglichen Menge von BFU-E bzw. CFU-E führt.

Erythroblasten sind ebenfalls nicht zu einer Teilung befähigt. In ihnen findet die Hämoglobinsynthese statt. Wenn sie reifen, kondensiert der Kern und die Zelle schrumpft auf einen Durchmesser von etwa 7 µm. Der Zellkern wird ausgestoßen und die membranumhüllten Zellorganellen werden abgebaut. Die so gereiften Retikulozyten verlassen schließlich das Knochenmark um in das zirkulierende Blut einzuwandern und dort innerhalb von ca. 24 h zu vollentwickelten Erythrozyten heranzureifen.



**Abb. 1** Schnittstellen der Wirkung von EPO während der Hämatopoese

(modifiziert nach G. Croston; <http://de.wikipedia.org/wiki/Erythropoetin>)

#### 2.1.4 Ursachen von Anämien beim Schwein

Hausschweine in konventioneller Haltung leiden häufig unter Anämien. Diese können entweder durch spezifische Erkrankungen, die zu einer Blutarmut führen, verursacht werden oder eine Begleiterscheinung einer anderen Krankheit sein. Oft führen chronische Infektionen sekundär durch die Dauerbelastung des Organismus zu einer Verminderung der Erythropoese (siehe Kap. 2.1.5.2).

Die beim Schwein am häufigsten diagnostizierte Form der Anämie stellt die Eisenmangelanämie dar. Sie kommt v. a. bei Ferkeln vor. Ferkel haben, bedingt durch ihr schnelles Wachstum, einen hohen Bedarf an Eisen. Die Sauenmilch dagegen ist eisenarm und die Tiere sind in der konventionellen Haltung im Stall nicht in der Lage durch Aufnahme von Erde ihren Eisenbedarf zu decken. Daher kommt es in den ersten Lebenswochen häufig zu einem Mangel, der zu einer hypoplastischen Anämie führt. Zur Vorbeugung wird den Ferkeln beispielsweise innerhalb der ersten drei Lebenstage und in der dritten Lebenswoche je 200 mg Eisen appliziert (Zaremba 2002).

Eisenmangelanämien bei Mastschweinen oder adulten Tieren sind meist durch chronische Blutverluste bedingt. Erkrankungen, die zu einem Blutverlust führen, können z.B. Verletzungen, Vergiftungen (Rodentizide, Kupfervergiftung), Mangelernährung wie Vitamin-K- Mangel, blutende Magenulzera, hämorrhagische Enteritiden oder der Befall mit blutsaugenden Arthropoden sein (Plonait et al. 2004). Auch einige Magen-Darm-Nematoden können zu Anämie führen, wie z.B. der rote Magenwurm (*Hyostrogylus rubidus*), der Zwergfadenwurm (*Strongyloides ransomi*) und der Peitschenwurm (*Trichuris suis*) (Deplazes et al. 2013). Die Magen-Darm-Nematoden *Hyostrogylus rubidus* und *Trichuris suis* sind in der Lage über die Kapillaren der Schleimhaut Blut zu saugen. *Strongyloides ransomi* dagegen benötigt für seine Entwicklung eine Körperwanderung, die ebenfalls zu Blutverlusten führen kann. Die Larven dringen in das Kapillarsystem ein, werden anschließend von dort aus in die Lunge transportiert und gelangen über Trachea und Pharynx in den Darm. Diese Körperwanderung führt zu Hämorrhagien, die sich bei entsprechend starkem Befall in klinisch manifesten Anämien zeigen können (Deplazes et al. 2013).

Die wichtigsten Durchfallerkrankungen des Schweins, die zu hämorrhagischen Enteritiden führen, sind die Infektion mit *Lawsonia intrazellularis* und die Schweinedysenterie. Bei *Lawsonia intracellularis* handelt es sich um ein obligat intrazellulär wachsendes, gram-negatives Stäbchenbakterium, das beim Schwein die porcine proliferative Enteropathie (PPE) auslöst (Rolle und Mayr 2007). Während bei Jungtieren meist das chronische Krankheitsbild

der porcinen intestinalen Adenomatose (PIA) vorherrscht, bei der es zur Hyperplasie der Darmschleimhaut und Verdickung der Mukosa kommt, zeigen ältere Mastschweine und Jungsauen oft das Bild der proliferativen hämorrhagischen Enteropathie (PHE). Diese verläuft akut bis perakut und ist durch blutig-wässrige Durchfälle gekennzeichnet. In den betroffenen Darmabschnitten können Blutkoagula gefunden werden. Häufig treten akute Todesfälle auf, teilweise ohne vorherige Symptome. Die Tiere verenden an Kreislaufversagen aufgrund des plötzlich einsetzenden massiven Blutverlustes (Rolle und Mayr 2007).

Der genaue Pathomechanismus, der zur Ausbildung der jeweiligen Symptome führt ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass immunologische Reaktionen zu der Ausbildung des jeweiligen Krankheitsbildes führen. Bei Tieren mit den Symptomen der PHE kann der Erreger im Gegensatz zu Tieren mit PIA zusätzlich in der Lamina propria gefunden werden, wo sie von Makrophagen phagozytiert werden (Smith und Lawson 2001; Macintyre 2003). Eine massive Produktion von Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$  führt zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Gefäßendothelien, so dass es zu Blutungen ins Darmlumen kommt (Macintyre 2003). Bei den Tieren, die die Symptome der PHE zeigen, fällt die Immunantwort stärker aus und es konnten B-Zellen gefunden werden, die IgM-Moleküle an deren Oberfläche exprimieren (McOrist et al. 1992). Ob allerdings die Immunreaktion allein für das jeweilige Krankheitsbild verantwortlich ist, oder ob evtl. auch die Erregerzahl eine Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt.

Der Erreger der Schweinedysenterie, *Brachyspira hyodysenteriae*, ist ein gram-negatives, strikt anaerobes Schraubenbakterium. Die Infektion führt vorwiegend bei Läufern und jungen Mastschweinen zu einer hämorrhagischen Entzündung der Dickdarmschleimhaut mit blutigem Durchfall (Rolle und Mayr 2007). Meist verläuft die Erkrankung chronisch und ist weltweit mit hohen wirtschaftlichen Schäden verbunden.

Des Weiteren spielen beim Schwein hämorrhagisch-septikämisch verlaufende Allgemeinerkrankungen eine Rolle bei der Entstehung von Anämien. Dazu gehören z.B. parasitäre Erkrankungen wie die Infektion mit *Sarcocystis miescheriana*, welche in der hier vorliegenden Arbeit als Modell diente (siehe auch Kap. 2.1.4.1 und Kap. 3.1), aber auch Erkrankungen bakteriellen oder viralen Ursprungs. Beispiele hierfür sind die Infektion mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), die klassische und die afrikanische Schweinepest aber auch die Circovirus-Infektion (PCV-2). Allen Erkrankungen gemeinsam ist das Auftreten von Permeabilitätsstörungen und Blutungen in die Unterhaut oder in Organe, die sich in Form von Petechien oder Hämorrhagien zeigen und auf eine generalisierte oder lokale

Vaskulitis zurückzuführen ist. Sowohl bei der afrikanischen als auch der klassischen Schweinepest kommt es zusätzlich zu Gerinnungsstörungen, bedingt durch Thrombozytopenie und DIC. Außerdem sind die Viren in der Lage, sich direkt in den Endothelzellen der Blutgefäße zu vermehren und diese dadurch zu schädigen (Übersicht in Blome 2006). Bei der Infektion mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* dagegen steht die Produktion von Exotoxinen im Vordergrund, welche ebenfalls zytotoxische Effekte auf die Endothelzellen des Gefäßsystems ausüben (Serebrin et al. 1991). ApxI und ApxII sind in der Lage die Erythrozytenmembran direkt anzugreifen und eine Hämolyse zu induzieren (Übersicht in Frey et al. 1993). Mit Hilfe von Lipopolysachhariden in der Bakterienzellwand kann der Erreger Hämoglobin aus den lysierten Erythrozyten binden und das dort gespeicherte Eisen für den eigenen Stoffwechsel nutzen (Bélangier et al. 1995).

Die Infektion mit PCV-2 kann sich in verschiedenen Krankheitsbildern zeigen (Übersicht in Opriessnig et al. 2007). Das „*Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome*“ (PMWS) ist in erster Linie durch Kümern der Absatzferkel gekennzeichnet. Eine Anämie ist auf die häufig auftretenden Magenulzera zurückzuführen. Das Krankheitsbild des „*Porcinen Dermatitis und Nephropathie Syndrom*“ (PDNS) dagegen zeigt sich v. a. bei Masttieren. Die Krankheit verläuft akut bis perakut. Hier kann eine Vaskulitis nachgewiesen werden, die auf aktivierte Endothelzellen zurückzuführen ist. Als Folge einer DIC kommt es zu Petechien und Hämorrhagien in die Unterhaut, unter die Nierenkapsel, aber auch in andere Organe (Marks et al. 2010). Aufgrund einer Glomerulonephritis kann sich eine Hämaturie ausbilden. Es wird vermutet, dass ein Immunkomplexgeschehen für die Ausbildung der Symptome verantwortlich ist.

Erkrankungen des Schweins, die primär mit einer Hämolyse assoziiert sind, sind die Babesiose und die Eperythrozoonose (Plonait et al. 2004). Bei der Babesiose handelt es sich um eine durch Zecken übertragene Erkrankung, bei der es durch *Babesia spp.* zu einer Zerstörung der Erythrozyten kommt. Neben der Anämie zeigen befallene Tiere eine ausgeprägte Hämoglobinurie, Hämoglobinämie und Ikterus. Die typischen Symptome sind hohes Fieber, Schwäche, Inappetenz und Dyspnoe. Bei trächtigen Tieren kann es zum Abort kommen. Die Babesiose kann auch zu plötzlichen Todesfällen führen; es sind aber genauso subklinische Verläufe bekannt.

Die Babesiose ist in Deutschland nicht endemisch und kommt in Südeuropa und Afrika vor.

Die Eperythrozoonose ist dagegen weltweit verbreitet und stellt eine meist latent verlaufende Faktorenkrankheit dar. Häufig treten Symptome im Zusammenhang mit einer PRRSV-Infektion auf. Die Übertragung erfolgt über das Blut, aber auch durch orale Aufnahme des Erregers. Läuse spielen bei der Übertragung ebenfalls eine Rolle.

Die Erreger haften an der Erythrozytenmembran. Während der Abwehrreaktion werden Auto-Antikörper gebildet, die sich gegen die Erythrozyten richten. Es kommt zu einer hämolytischen Anämie. Typische Symptome sind hohes Fieber, Blässe der Haut mit rötlich gefärbtem Ohrrand bis hin zu Ohrrandnekrose und Dyspnoe. Ikterus ist dagegen eher selten zu sehen. Die Erkrankung tritt meist subklinisch oder chronisch auf (Plonait et al. 2004).

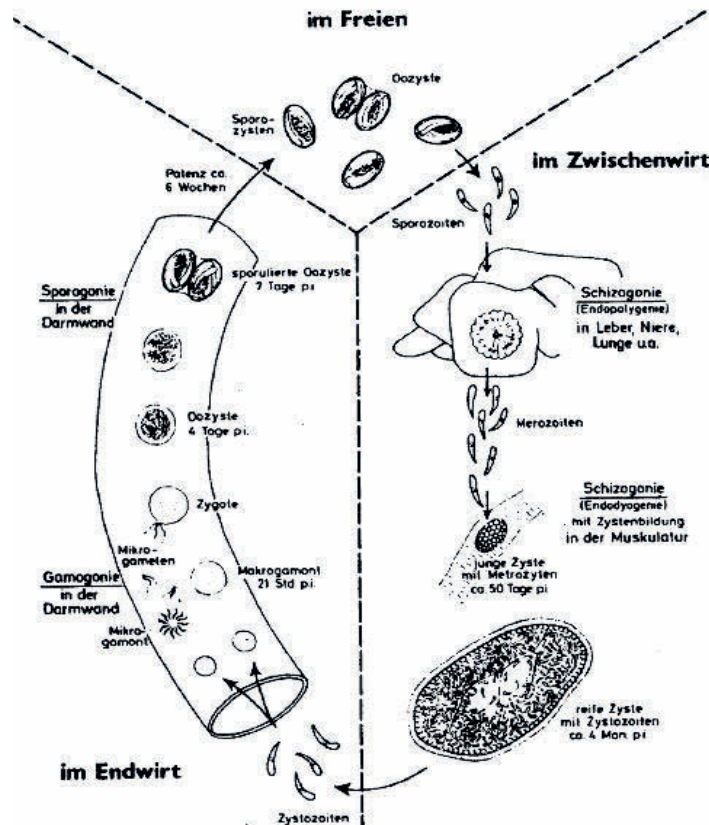
#### **2.1.4.1 Sarcocystis miescheriana**

*Sarcocystis miescheriana* gehört zum Stamm der Apicomplexa, Gattung Sarcocystis. Es handelt sich um einen obligat heteroxenen, intrazellulär parasitierender Einzeller, dessen Endwirte der Hund und andere Carnivoren darstellen. Das Schwein dient dabei als Zwischenwirt.

Der Parasit ist vermutlich weltweit verbreitet. Außer in Europa wurde *Sarcocystis spp.* auch in den USA (Dubey und Powell 1994), sowie in Indien (Saleque und Bhatia 1991), Japan (Saito et al. 1998), auf den Philippinen (Claveria et al. 2001) und im Iran (Kia et al. 2011) nachgewiesen.

Studien aus Deutschland zeigen, dass in Südhessen 29 % der Sauen Antikörper gegen *Sarcocystis spp.* aufweisen (Damriyasa et al. 2004). Im Jahr 1987 waren in Nordwestdeutschland sogar 69 % der Schlachtsauen seropositiv; bei zwei Drittel der Schlachtschweine konnte *S. miescheriana* und bei einem Drittel *S. suis* nachgewiesen werden (Furmanski 1987).

Die Infektion des Schweins erfolgt durch orale Aufnahme von Sporozysten, die mit dem Kot der Endwirte ausgeschiedenen werden. Jede Sporozyste enthält vier Sporozoiten, die im Darm freigesetzt werden. Über den Blutweg gelangen die Sporozoiten in die Leber, wo am 6. – 7. Tag p.i. die erste ungeschlechtliche Vermehrung (Schizogonie) in den Endothelzellen der venösen Lebergefäße stattfindet. Ab dem 8. Tag p.i. finden sich die Merozoiten (Tochterzellen) in den Endothelzellen aller Organe. Am 12. – 14. Tag findet eine zweite Schizogonie statt. Ab dem 27. Tag p.i. wandern die Merozoiten in Muskelzellen ein, wo sie die für die Erkrankung typischen Gewebezysten, Mieschersche Schläuche genannt, ausbilden. In ihnen reifen die für den Endwirt infektiösen Zystozoiten.



**Abb. 2** Entwicklungszyklus von *S. miescheriana*

(schematisch nach Rommel 1979)

Die Endwirte infizieren sich durch orale Aufnahme der zystenhaltigen Muskulatur. Die Zystoziten werden im Dünndarm freigesetzt, wandern in die Lamina propria der Mukosa ein und entwickeln sich zu Mikro- bzw. Makrogamonten. Nach 18 Tagen p.i. kommt es zu einer Gamogonie mit Bildung einer Oozyste, in der die infektiösen Sporozysten heranreifen, die dann mit dem Kot ausgeschieden werden.

Während beim Endwirt eine *S. miescheriana*-Infektion nahezu symptomlos verläuft, kann es beim Zwischenwirt Schwein bei Aufnahme einer größeren Menge von Sporozysten zu ausgeprägten Symptomen, wie Fieber, Apathie, Inappetenz, Leistungseinbußen, Dyspnoe und Anämie kommen (Erber und Geisel 1979; Zielasko et al. 1981; Barrows et al. 1982). Auch akute Todesfälle sind möglich, v.a. wenn Zysten in großer Zahl in Herzmuskelzellen gebildet werden (Daugshies et al. 1989b). Durch die Bildung der sog. Miescher'schen Schläuche kommt es zu einer Zerstörung von Muskelfasern durch hyalinschollige Muskeldegeneration. In der Serologie werden daher ab Tag 27 p.i. deutlich erhöhte Muskelenzyme nachgewiesen.

Als Ursache der Anämie wird eine extravaskuläre Hämolyse diskutiert. Aber es können auch Blutungen aufgrund der Zerstörung der Endothelzellen auftreten (O'Donoghue und Rommel 1992). Außerdem wurde eine vermehrte hämorrhagische Diathese verbunden mit einer Koaguloopathie und daraus resultierender disseminierten intravasalen Gerinnung nachgewiesen (Barrows et al. 1982; Dauschies et al. 1989a). Die pathologisch-anatomischen Befunde reichen von Petechien über Ekchymosen der Haut, des perimuskulären Bindegewebes und der serösen Häute von Lunge, Herz, Darm, Niere und Blase bis hin zu schweren Ergüssen in Körperhöhlen und Perikard. Als Folge einer Koagulopathie können Thromben im Kapillarbereich des Herzens entstehen (Barrows et al. 1982).

Die klinischen Symptome der chronischen Sarcocystose (ab Tag 42 der Infektion) sind je nach Menge der aufgenommenen Sporozysten unterschiedlich stark ausgeprägt. Auch hier kann es zu einer erneuten Erhöhung der Körpertemperatur und der Herzfrequenz und einem gestörten Allgemeinbefinden kommen (Reiner et al. 2002a). Die wirtschaftlichen Einbußen sind bedingt durch eine geringere tägliche Zunahme der Mastschweine, aber auch die Verluste durch die lebensmittelrechtliche Beanstandung von zystenhaltigem Fleisch. Nach der überstandenen Infektion bildet sich eine vorübergehende Immunität aus, die allerdings bereits nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar ist (Weber et al. 1983).

In Deutschland spielen durch *S. miescheriana* hervorgerufene Erkrankungen nur noch eine untergeordnete Rolle. Trotzdem wurde der Parasit für die hier vorliegende Arbeit ausgewählt. Er eignet sich sehr gut für exemplarische Infektionsversuche, da es sich nicht um einen Zoonoseerreger handelt und eine direkte Übertragung von Schwein zu Schwein ausgeschlossen ist. Außerdem ist die Ausprägung der klinischen Symptome anhand der verabreichten Menge von Sporozysten sehr gut steuerbar, was auch dem tierschützerischen Aspekt eines solchen Infektionsversuchs entgegen kommt. Durch den biphasischen Verlauf mit der Ausbildung einer akuten und einer chronischen Krankheitsphase eignet sich die Erkrankung zudem gut als Modell zur Untersuchung der Ereignisse sowohl bei akuten als auch bei chronischen Anämien.

## **2.1.5 Pathogenese der Eisenmangelanämie und der Anämie als Begleiterscheinung von chronischen Erkrankungen**

### **2.1.5.1 Eisenmangelanämie**

Zu einer Eisenmangelanämie kann es durch eine zu geringe Eisenaufnahme über die Nahrung, wie es häufig bei Ferkeln der Fall ist, oder durch chronische Blutverluste kommen. Beim gesunden Organismus wird Eisen über die Darmschleimhaut resorbiert. Das Eisen kann anschließend entweder in den Enterozyten in Form von Ferritin gespeichert werden oder es wird an Transferrin gebunden und an das Blut abgegeben. Von hier aus gelangt es ins Knochenmark. Dort steht es der Hämoglobinsynthese zur Verfügung und wird an Hämoglobin gebunden in Proerythroblasten eingebaut. Überalterte Erythrozyten werden von Makrophagen in der Milz abgebaut. Das an das Hämoglobin gebundene Eisen wird zum Teil wieder freigesetzt und erneut an Transferrin angelagert. Es kann so zurück zum Knochenmark transportiert werden und steht dort erneut zur Produktion von Hämoglobin zur Verfügung. Oder es bleibt in Form von Ferritin oder Hämosiderin in den Makrophagen gespeichert, um erst bei erhöhtem Bedarf freigesetzt zu werden (Aurich und Engelhardt 2010).

Bei akut auftretenden Blutungen, die bereits nach kurzer Zeit gestoppt werden können, ist der Organismus meist in der Lage durch eine verstärkte Erythropoese einer Anämie entgegenzuwirken, so dass bereits wenige Tage nach dem Trauma wieder normale Blutwerte gemessen werden. Aufgrund der fortwährend gesteigerten Erythropoese bei chronischen Blutverlusten sind die Eisenspeicher jedoch bald erschöpft, so dass auch hier eine chronische Eisenmangelanämie entsteht.

Der wichtigste Regulator des Eisenstoffwechsels stellt das Protein Hepcidin dar. Es kontrolliert die Eisenresorption im Darm, wie auch die Abgabe des Eisens aus Makrophagen. Eine vermehrte Hepcidinproduktion führt zu einer Downregulation der Eisentransporter in den Enterozyten, so dass eine geringere Menge Eisen aus dem Darm aufgenommen wird. Gleichzeitig wird weniger Eisen aus phagozytierten Erythrozyten freigesetzt. Die Produktion von Hepcidin wird von verschiedenen Zytokinen und Transkriptionsfaktoren beeinflusst. HIF1- $\alpha$  hemmt unter Hypoxie die Bildung von Hepcidin und stimuliert gleichzeitig die Transkription des EPO-Gens (Peyssonnaud et al. 2007; Liu et al. 2012). IL-6 dagegen erhöht die Hepcidinproduktion (Nemeth 2002; Wrighting und Andrews 2006). Aufgrund der Einwirkung dieser proinflammatorischen Zytokine auf den Eisenstoffwechsel spielt die

Eisenmangelanämie eine große Rolle bei der Entstehung der Anämie chronischer Erkrankungen.

### **2.1.5.2 Anämie chronischer Erkrankungen**

Chronische oder intermittierend auftretende Erkrankungen spielen in vielen schweinehaltenden Betrieben eine große Rolle. Der Infektionsdruck ist in den Schweinehaltungen permanent hoch. Die hohe Besatzdichte fördert v. a. den Ausbruch von Faktorenkrankheiten, die erst dann zum Ausbruch kommen, wenn das Immunsystem bereits durch andere Erkrankungen, Stress oder Hygiene- und Haltungsmängel beeinträchtigt ist. Eine kurze Mastdauer, ungenügende Reinigung und Desinfektion der Anlagen, eine hohe Remontierungsrate und häufiges Umstallen der Tiere verstärken das Problem zusätzlich.

Die permanente Stimulierung des Immunsystems führt zu einer dauerhaften Freisetzung von Zytokinen, welche einen Einfluss auf die Blutbildung haben. Die wichtigsten an der Anämie chronischer Erkrankungen beteiligten Zytokine sind TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , und - $\gamma$  (Übersicht in Guidi und Lechi Santonastaso 2010). IL-1 und IL-6 greifen in den Eisenstoffwechsel ein, indem sie transkriptionsfördernd für Heparin wirken und zu einer vermehrten Synthese des Proteins führen (Lee et al. 2005; Wrighting und Andrews 2006), (Nemeth 2002). Es kommt zu einer verringerten intestinalen Eisenaufnahme und zu einer gestörten Freigabe des Eisens aus den Makrophagen. Das Eisen bleibt in diesen in Form von Ferritin gespeichert. Es entsteht ein funktioneller Eisenmangel. Dies resultiert in einer Eisenmangelanämie bei gleichzeitig erhöhtem Ferritin (Demarmels Biasiutti 2010).

Die Anämie chronischer Erkrankungen ist außerdem durch eine verminderte Proliferation, eine gesteigerte Apoptose sowie eine geringere Ansprechbarkeit der erythroiden Vorläuferzellen auf Erythropoetin aufgrund einer Downregulation der Epo-Rezeptoren gekennzeichnet (Roodman 1987). Wichtigstes Zytokin stellt hier TNF- $\alpha$  dar. Durch TNF- $\alpha$  verringert sich das Wachstum erythroider Vorläuferzellen wie BFU-E und CFU-E (Roodman et al. 1987). Weitere Zytokine, die einen pro-apoptotischen Effekt auf BFU-E und CFU-E ausüben sind IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 (Roodman 1987; Wang et al. 1995; Übersicht in Weiss 2009).

Sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  steigern die Aktivität von GATA-2 und NF- $\kappa$ B in der Erythropoetin-produzierenden Zelllinie HepG2 (La Ferla et al. 2002). Beide Transkriptionsfaktoren wirken negativ regulierend auf das EPO-Gen und können so eine

verringerte Bildung von Erythropoetin zur Folge haben (La Ferla et al. 2002). Außerdem vermitteln GATA-Faktoren eine Down-Regulation der Transkription des EPO-Rezeptorgens (Roodman 1987). (siehe Kap. 2.5.3.2 und 2.5.3.3.1)

IFN- $\gamma$  ist der stärkste Inhibitor der erythroiden Vorläuferzellen (Guidi und Lechi Santonastaso 2010). Eine Expression dieses Zytokins führt ebenfalls zu einer Downregulation der Epo-Rezeptoren an der Oberfläche (Taniguchi et al. 1997). Außerdem konnte eine verminderte Epo-Aktivität in Zusammenhang mit IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Weiss 2009). Gleichzeitig führt die Expression zu einer verringerten Bildung pro-hämatogener Faktoren wie dem „Stem Cell Faktor“ (Taniguchi et al. 1997).

## 2.2 Variationen im roten Blutbild beim Schwein

### 2.2.1 Rasseunterschiede

Die Referenzwerte des roten Blutbildes sind, wie auch die des weißen Blutbildes und der klinisch-chemischen Parameter, rasseabhängig. Dies ergaben Untersuchungen an verschiedenen europäischen Schweinerassen (Kixmüller 2004). Pietrain oder Meishan-Schweine haben z.B. eine signifikant höhere Erythrozytenzahl als Schweine der Deutschen Landrasse oder Deutsche Edelschweine. Unterschiede bestehen auch im Hämatokrit, Hämoglobingehalt und MCHC.

**Tabelle 2 Referenzwerte der verschiedenen Schweinerassen**

	Pietrain	Meishan	Deutsche Landrasse	Deutsches Edelschwein	Duroc	Minipig
Erythrozyten (T/l)	5,85-8,21	6,08-8,68	5,11-7,87	5,34-7,82	5,69-8,09	6,19-9,99
Hämatokrit (%)	0,31-0,43	0,32-0,44	0,30-0,42	0,30-0,42	0,31-0,43	0,27-0,51
Hämoglobin (mmol/l)	6,6-9,0	6,5-8,9	6,3-8,7	6,3-8,3	6,5-8,5	5,6-10,8
MCHC (mmol/l)	20,3-21,9	19,6-21,2	19,4-21,8	19,0-21,8	19,9-21,9	20,1-21,7

(Kixmüller 2004)

## 2.2.2 Genetische Unterschiede

### 2.2.2.1 Genvarianten für Parameter des roten Blutbilds beim Schwein

Auf genetischer Ebene konnten bereits einige merkmalsbestimmende Varianten beim Schwein identifiziert werden, die mit den Parametern des roten Blutbildes korrelieren.

Die erste umfangreiche Studie zur Detektion von Genvarianten wurde von Reiner et al. (2007) anhand einer F<sub>2</sub>-Kreuzungspopulation der Rassen Meishan und Pietrain nach Infektion mit dem Erreger *S. miescheriana* durchgeführt. Insgesamt konnten in dieser Studie 43 QTL auf 16 Chromosomen kartiert werden. Unter QTL (*Quantitative Trait Loci*) versteht man einen Abschnitt eines Genoms, welcher nachgewiesen einen Einfluss auf die quantitative oder qualitative phänotypische Ausprägung eines Merkmals hat (Geldermann 1975). Bis heute sind insgesamt mehrere hundert QTL für die Parameter Hkt, RBC, Hb, MCH, MCV, MCHC und RDW bekannt. Allein für den Hämatokrit existieren 238 QTL ([www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/summary](http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/summary), Stand 29.07.2016).

Die QTL mit der höchsten Signifikanz in der Studie von Reiner et al. (2007) liegen auf den Chromosomen 2, 5, 7, 8, 12, 13 und 18. Der QTL auf Chromosom 2 erklärt während der chronischen Krankheitsphase 13,4% der phänotypischen Variation im Hämatokrit, Hämoglobingehalt und bei der Anzahl an roten Blutzellen. Im Bereich dieses QTL liegt das Kandidatengen für den Erythropoetin-Rezeptor (Reiner et al. 2007). Ein weiterer QTL konnte auf Chromosom 3 kartiert werden. In diesem Bereich liegt das Kandidatengen für den Wachstumsfaktor Erythropoetin (Reiner et al. 2007).

Zusätzliche QTL im Zusammenhang mit dem roten Blutbild konnten von Watrang et al. (2005), Zou et al. (2008) und Gong et al. (2010) ermittelt werden. Einige der bereits von Reiner et al. kartierten QTL wurden in den Studien von Zou et al. (2008) und Gong et al. (2010) bestätigt, aber es wurden auch weitere QTL zusätzlich detektiert. Die Kandidatengene EPO und EPOR konnten bestätigt werden, da auch in diesen Studien signifikante QTL in den Bereichen dieser Gene gefunden wurden (Gong et al. 2010). Hochsignifikante QTL-Effekte für die Parameter RBC, MCV und MCH zeigen sich auf Chromosom 8 in der Nähe des KIT-Gen-Locus (Watrang et al. 2005; Cho et al. 2011a), welches als weiteres Kandidatengen für Parameter des roten Blutbildes identifiziert werden konnte. Einer der detektierten QTL assoziiert mit dem Hämoglobingehalt (Watrang et al. 2005) und mehrere QTL-Effekte zeigen einen Zusammenhang mit RBC, MCV und MCH (Cho et al. 2011a).

Da die Konfidenzintervalle der QTL generell sehr weit sind und in den QTL-Bereichen meist mehrere hundert funktionelle Gene liegen, wurde in neueren Studien meist die Methode der „Genome-wide Association Study – GWAS“ angewendet. In der Aktuellsten von Zhang et al.

(2014) konnten insgesamt 499 SNPs detektiert werden, von welchen 154 SNPs eine genomweite Signifikanz mit verschiedenen Parametern des roten Blutbilds aufzeigten. Auch in den Jahren zuvor durchgeführten Studien zeigten sich signifikante Assoziationen (Luo et al. 2012; Wang et al. 2013; Zhang et al. 2013; Jung et al. 2014). Auf jedem der 18 Autosomen des Schweins und dem X-Chromosom liegen Genmarker die mit den Parametern des Blutbildes assoziieren. Die für das rote Blutbild wichtigsten Marker wurden auf den Chromosomen 2, 6, 7 und 8 kartiert. Als weitere wichtigste potentielle Kandidatengene neben EPO und EPOR konnten anhand von QTL-Analysen und GWAS das KIT-Gen auf Chromosom 8 und das ERG-Gen auf Chromosom 7 identifiziert werden (Whattrang et al. 2005; Zhang et al. 2013; Jung et al. 2014). In deren Nähe liegen nicht nur die meisten der gefundenen SNPs, sondern auch diejenigen mit der höchsten Signifikanz in Assoziation mit MCV und MCH (Zhang 2013; Jung 2014). Der in der Studie von Luo et al. (2012) am höchsten signifikante SNP liegt in der Nähe des Gens der Guanylatcyclase 1, welches ebenfalls auf Chromosom 8 liegt. Zwei weitere SNPs liegen jedoch auch hier wieder im KIT-Gen (Luo et al. 2012).

#### **2.2.2.1.1 KIT als Kandidatengen für die Blutbildung beim Schwein**

Das KIT-Gen des Schweins liegt auf Chromosom 8 (Sakurai et al. 1996) und stellt ein Kandidatengen für die Blutbildung dar. Sein Genprodukt ist die Tyrosinkinase c-kit. Das Protein kommt in der Membran aller hämatopoetischen Stammzellen vor und ist der Rezeptor für den *Stammzellfaktor* (SCF). SCF ist ein Wachstumsfaktor der hämatopoetischen Vorläuferzellen und unterstützt insbesondere die Proliferation und Differenzierung. Zusätzlich ist c-kit an der Ausbildung des Farbstoffs Melanin und der Keimzellbildung beteiligt (Russell 1979). Eine Mutation im ersten Nukleotid von Intron 17 des Kit-Gens des Schweins bewirkt alternatives Spleißen (Marklund et al. 1998). Der mutierte Rezeptor besitzt eine normale Bindungsaktivität für Liganden, jedoch eine niedrigere Tyrosinkinase-Aktivität (Marklund et al. 1998). Die Mutation hat Auswirkungen auf den Hämoglobinspiegel aber auch auf MCH II - Moleküle, wobei das Allel  $l^1$  mit niedrigeren Hämoglobingehalten korreliert (Wattrang et al. 2005). Außerdem entwickeln Ferkel des Genotyps  $l/l$  im Alter von fünf Wochen häufiger eine Anämie als Tiere des Genotyps  $l/l^{Be*}$ , wenn sie statt der üblichen zwei Eiseninjektionen nur eine erhalten (Johansson et al. 2005).

Außer beim Schwein sind auch bei Mäusen Mutationen im KIT-Gen bekannt, die einen Einfluss auf die Erythropoese besitzen (Russell 1979; Jackson 1994). Dagegen hat eine im

KIT-Gen von Pferden der Rasse Freiberger vorkommende Mutation, welche zwar zur Ausbildung einer weißen Fellfarbe führt, keinen Einfluss auf die Blutbildung (Haase et al. 2010)

#### **2.2.2.2 Genvarianten für Parameter des roten Blutbilds bei anderen Nutztieren**

Nicht nur beim Schwein, sondern auch bei anderen Nutztieren wie Rind, Schaf und Huhn existieren bereits bekannte Genvarianten, die Auswirkungen auf die Ausprägung des roten Blutbildes haben. Schon 1973 konnten Roberts und Gray (1973) eine natürliche Resistenz bei Rindern der Rasse N'Dama gegenüber Trypanosomen nachweisen. An dieser Resistenz scheinen zwei voneinander unabhängige Mechanismen beteiligt zu sein: Erstens eine Verminderung der Parasitenvermehrung im Blut, die jedoch nicht im Zusammenhang mit der Immunabwehr steht, und zweitens eine verbesserte Kontrolle der Anämie durch die Blutzellen (Naessens 2006).

Auf genetischer Ebene konnten insgesamt 40 QTL auf 18 Chromosomen für diese Resistenz identifiziert werden (Hanotte et al. 2003). Die QTL für die Ausprägung des roten Blutbilds im Zusammenhang mit einer Trypanosoma-Infektion liegen auf Chromosom 1, 2, 17, 20, 22, 24, 25 und 27 ([http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/ontrait?trait\\_ID=1464](http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/ontrait?trait_ID=1464)).

Orru et al. (2012) konnten einen Zusammenhang des Leptin-Gens mit der Blutbildung beim Rind darstellen. Die SNPs g.1759G>C und g.2033C>T haben einen signifikanten Einfluss auf Parameter des roten Blutbildes. Das C-Allel, bzw. T-Allel bewirkt eine signifikante Erhöhung von RBC und RDW, wogegen bei Tieren, die diese Allele tragen, die Werte für MCH und MCV niedriger ausfallen (Orru et al. 2012). Das Leptin-Gen des Rindes liegt auf Chromosom 4.

Charoensook et al. (2012) konnten eine weitere Korrelation der Höhe des Hämatokrits mit SNPs im Gen für das Hitzeschockprotein HSP90AB1 darstellen. Das Vorhandensein eines T-Allels bei einem SNP in Intron 9 (g.4338T>C, GenBank Acc. No. NW001494158) oder bei einem SNP in Exon 11 (g.5082C>T, GenBank Acc. No. NW001494158) korreliert signifikant mit höheren Hämatokritwerten. Allerdings ist davon auszugehen, dass es sich beim HSP90AB1-Gen nicht um ein Kandidatengen für den Hämatokrit handelt und die genannten SNPs wahrscheinlich Marker darstellen. Denn nicht alle Individuen der Tiergruppe mit den höchsten Hämatokritwerten tragen das T-Allel, welches mit einem höheren Hämatokrit

korreliert (Charoensook et al. 2012). Das HSP90AB1-Gen liegt beim Rind auf Chromosom 23 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=HSP90AB1+cattle>).

Bei Schafen existieren insgesamt 14 QTL für den Hämatokrit ([http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/OA/ontrait?trait\\_ID=3247](http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/OA/ontrait?trait_ID=3247), Stand 29.07.2016). Diese liegen auf den Chromosomen 2, 3, 13, 18, 22 und 26. Die QTL konnten im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber Darmparasiten bei verschiedenen Schafrassen ermittelt werden (Silva et al. 2012; Marshall et al. 2013; Periasamy et al. 2014).

QTL-Analysen beim Huhn detektierten insgesamt sieben QTL für den Hämatokrit, sechs für Hämoglobingehalt und 7 für MCV ([http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/GG/ontrait?trait\\_ID=2293](http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/GG/ontrait?trait_ID=2293), Stand 29.07.2016).

### 2.2.3 QTL-Analyse

Die QTL-Analyse stellt eine Methode zur Detektion von merkmalsbestimmenden Genloci dar. Sie wurde auch in Vorversuchen für die hier vorliegende Arbeit mit dem Ziel der Detektion von Genvarianten im Zusammenhang der Krankheitsresistenz gegenüber *S. miescheriana* beim Schwein gewählt. Als Tiermodell dient eine F<sub>2</sub>-Kreuzungspopulation, ausgehend von zwei genetisch und phänotypisch möglichst stark divergierenden Ausgangsrassen (Falconer und Mackay 1996). Als gut geeignet gelten Kreuzungen zwischen europäischen und chinesischen Rassen, aber auch zwischen Wildschwein und Hausschwein, da sie mit hoher Wahrscheinlichkeit hinsichtlich der Zielmerkmale unterscheiden, was in Vorversuchen abgeklärt werden muss, und weil die verglichenen Rassen meist für viele Marker unterschiedliche Allele tragen (Thuy et al. 2006). Mit Hilfe eines Infektionsversuchs kann die Merkmalsausprägung der einzelnen Individuen verstärkt werden. Das unterstützt dabei das Auffinden von QTL. Die Aufzucht und Infektion der Tiere muss unter standardisierten Bedingungen erfolgen um Umwelteinflüsse weitgehend auszuschalten. Außerdem sind geeignete Laborverfahren, Genkarten und Genmarker sowie geeignete statistische Verfahren zur Durchführung nötig (Falconer und Mackay 1996).

Um die QTL-Analyse durchführen zu können, muss das Genom möglichst gleichmäßig mit informativen Markern abgedeckt werden. Marker gelten dann als informativ, wenn sie segregierende Allele aufweisen. Außerdem sollen die Markerabstände möglichst gleichmäßig über das Genom verteilt sein. Abstände um 20 cM werden als ausreichend angesehen (Darvasi 93). Beim Schweinegenom mit einer Gesamtlänge von ca. 2,3 Morgan sind dafür ca.

80 bis 100 hochpolymorphe Marker notwendig. Der Bereich zwischen zwei Markern umfasst dann ca. 15-20 Mio. Basenpaare. Aufgrund ihrer Lage im Genom und ihres Variantenreichtums werden häufig Mikrosatelliten eingesetzt; wie auch in der Studie von Reiner et al. (2007). Statt der Verwendung von Mikrosatelliten ist der Einsatz von SNPs ebenfalls möglich.

Im Anschluss erfolgt eine Zuordnung der Markerallele zu der empfindlichen oder unempfindlichen Elterngeneration. Anhand von Kopplungsanalysen können eventuelle Assoziationen des zu untersuchenden Merkmals und den Markerallelen bestimmt werden. Die QTL-Analyse errechnet die Positionen im Genom, an denen die engste Kopplung zwischen dem zu untersuchendem Phänotyp und dem Markerallel liegt. Als Maß dienen dabei der F-Wert und der LOD-Score (Morton 1955). Die Position des QTL liegt dort, wo der höchste F-Wert erreicht wird. Idealerweise tragen die phänotypisch empfindlichen F<sub>2</sub>-Tiere nur Allele der empfindlichen Foundergeneration und die resistenten F<sub>2</sub>-Tiere nur Allele der resistenten F<sub>0</sub>-Generation. Tiere, die beide Allele tragen, sollten in ihrer Merkmalsausprägung zwischen den empfindlichen und unempfindlichen Tieren liegen (Berge 2008).

Die Methode der QTL-Analyse, wie sie in den Vorversuchen zur aktuellen Arbeit praktiziert wurde, bringt zwei große Nachteile mit sich: Zum einen erlaubt die Untersuchung einer F<sub>2</sub>-Familie keine Feinauflösung der Effekte benachbarter Gene. Zum anderen stehen nicht genügend Mikrosatelliten zur Verfügung, um eine Feinkartierung zu ermöglichen. Heute versucht man mit Whole Genome Analysen auf Basis von SNP-Chips oder von Next Generation Sequenzierungsverfahren, die direkt in kommerziellen Populationen mit segregierenden Merkmalen angewandt werden. Allerdings sind solche Untersuchungen extrem aufwändig und teuer, so dass sich die Abklärung von QTL für die Zielmerkmale im Vorfeld bewährt hat. Für das Schweinegenom ist ein SNP-Chip mit den Namen Porcine SNP60, der 64 232 SNPs umfasst, kommerziell erhältlich (Ramos et al. 2009; Fan et al. 2011). Die Methode der Whole Genome Association wurde neben der Detektion von SNPs, die mit Reproduktionsparametern (Onteru et al. 2012) oder mit der Hautfarbe beim Schwein (Cho et al. 2011b) korrelieren auch schon zur Detektion von Parametern des roten Blutbildes (Zhang et al. 2013; Jung et al. 2014) erfolgreich eingesetzt.

### **2.3 Genetische Krankheitsresistenz beim Schwein**

Natürliche Krankheitsresistenzen unserer Nutztiere sind schon lange bekannt. Bereits 1942 konnten Cameron et al. (1942) beim Schwein genetische Unterschiede in der Empfindlichkeit

gegenüber *Brucella suis* nachweisen. Später wurden weitere Resistenzen gegenüber Rotlauf, Rhinitis atrophicans, Dysenterie (Hutt 1958), Leptospirose (Przytulski und Porzeczkowska 1980), PRRSV (Halbur et al. 1998; Reiner et al. 2010), Salmonellen, E.coli, Porcines Circovirus (Opriessnig et al. 2006) und der Aujeszký'schen Krankheit (Rothschild et al. 1984; Meeker et al. 198; Reiner et al. 2002b) detektiert. Auch Resistenzen gegenüber einigen Magen-Darm-Nematoden konnten identifiziert werden (Johnson et al. 1975).

Die weltweit ersten QTL für Krankheitsresistenz beim Schwein wurden anhand des Pseudorabies-Virus, der Erreger der Aujeszký'schen Krankheit kartiert. Zwei QTL auf Chromosom 6 und 9 zeigen eine signifikante Assoziation mit der Ausbildung von neurologischen Symptomen während der Infektion. In den Bereichen dieser QTL liegen die Geneorte von Rezeptoren, die in der Adsorption und Penetration des Pseudorabies-Virus in die Nervenzellen beteiligt sind (Reiner et al. 2002b). In der gleichen Studie konnten neben Merkmalen des roten Blutbildes auch QTL für Parameter des weißen Blutbildes, der Immunabwehr, Blutgase und für klin.- chemische Parameter kartiert werden (Reiner et al. 2007; Reiner et al. 2008; Reiner et al. 2009a; Reiner et al. 2009b). Eine Mutation im IRF-7 Gen konnte in Zusammenhang mit einer verbesserten Immunantwort gegenüber des Erregers *S. miescheriana* gebracht werden (Broke et al. 2011). Ein SNP im GOT1-Gen führt zu einer Verstärkung des QTL-Effekts für die Serum-Aspartat-Aminotransferase-Aktivität auf Chromosom 14. Man geht davon aus, dass eine Kopplung zwischen diesem SNP und dem eigentlichen QTN vorliegt, der allerdings bisher noch nicht identifiziert werden konnte (Reiner et al. 2010).

In aktuellen Studien werden derzeit QTL im Zusammenhang mit Salmonella-Infektionen (Uthe et al. 2011), PRRSV (Lunney und Chen 2010), (Uddin et al. 2011), (Jiang et al. 2012) und Lungenerkrankungen (Uddin et al. 2011), (Sørensen et al. 2011) beim Schwein erörtert. Im Zusammenhang mit „FUGATO“ (Funktionelle Genomanalyse im tierischen Organismus) wurden QTL für Resistenz gegen verschiedene Infektionen des Respirationstrakts, insbesondere gegen *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Reiner et al. 2014), kartiert. Zweiter Forschungsschwerpunkt stellt die Untersuchung von genetischen Einflussfaktoren auf die Fruchtbarkeit, insbesondere der Spermaqualität ([http://www.fbf-forschung.de/forschungsschwerpunkte\\_im\\_fbf.html](http://www.fbf-forschung.de/forschungsschwerpunkte_im_fbf.html)) und die Ausbildung des postpartalen Dysgalaktiesyndroms der Sau dar (Preissler 2013). Des Weiteren wird die Erforschung der Ursachen von Erbdefekten, und die genetischen Grundlagen für die Fundamentstabilität vorangetrieben (FUGATO - Funktionelle Genomanalyse im Tierischen Organismus 2011).

Insgesamt liegen bis heute 2464 QTL für Merkmale der Krankheitsresistenz beim Schwein vor (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/summary?summ=clas&qtl=14,479&pub=507&trait=592>; Stand 29.07.2016). Zusätzlich stehen weitere 12644 QTL für insgesamt 600 Merkmale zur Verfügung (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/summary>, Stand 29.07.2016). Die meisten davon beziehen sich auf Leistungsparameter wie Schlachtkörperqualität, Fleischqualität und Magerfleischanteil oder Produktionsparameter wie Futtermittelverwertung, tägliche Zunahmen der Masttiere, Geburts- und Schlachtendgewicht. Zusätzlich sind QTL für die Reproduktionsleistung bekannt, wie z.B. für die Wurfgröße, Totgeburtenrate und die Spermaqualität der Eber, aber auch QTL im Zusammenhang mit der Anatomie oder physiologischen Parametern wie Hormone oder Hautfarbe.

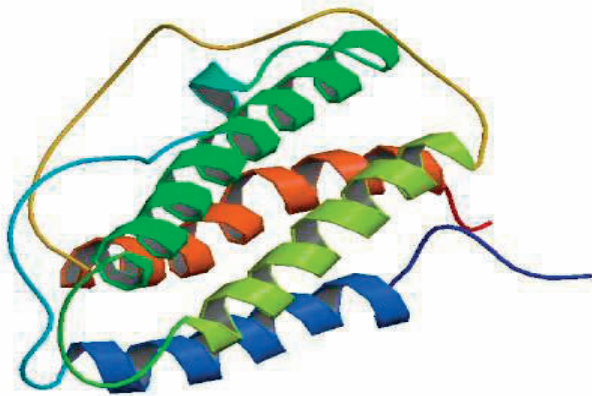
### **2.3.1 Resistenzunterschiede gegenüber *S. miescheriana* beim Schwein**

Mit Hilfe von Infektionsversuchen konnten Reiner et. al. (2002a) Resistenzunterschiede gegenüber *S. miescheriana* bei den Schweinerassen Pietrain und Meishan aufzeigen. Insgesamt 25 Tiere beider Rassen und beiden Geschlechts wurden jeweils mit 50 000 Sporozysten des Parasiten infiziert. Während des Versuchs zeigten sich signifikante Unterschiede in der Ausprägung der klinischen Symptome der unterschiedlichen Rassen. Während am Tag 42 – 45 p.i. bei der Rasse Meishan keine Veränderung der Körpertemperatur messbar war, stieg sie bei den Pietrain im Durchschnitt um 0,5 °C. Die Anzahl der Bradyzoiten im Muskelgewebe des *M. longissimus dorsi* und des Herzmuskels war bei den Pietrain zum Zeitpunkt der Euthanasie am Tag 70 p.i. 20 Mal höher als bei Meishan. Ebenfalls signifikante Unterschiede zeigten sich in der Leukozytenzahl, der Immunantwort und bei verschiedenen klinisch-chemischen Parametern wie der Creatinkinase, alkalischen Phosphatase, Laktat, Kreatinin, Bilirubin und verschiedenen Elektrolyten (Reiner et al. 2009). Diese Versuche konnten zeigen, dass in der Population von Meishan eine ausgeprägtere natürliche Krankheitsresistenz gegenüber *S. miescheriana* vorhanden ist, als bei den europäischen Pietrain-Schweinen.

## 2.4 Erythropoetin

### 2.4.1 Aufbau und Funktion

Erythropoetin ist ein 34 kDa großes Glykoprotein und besteht beim Schwein aus 194 Aminosäuren (David et al. 2001). In seiner Sekundärstruktur zeigt es die für die Proteine der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren typische Form von vier antiparallel angeordneten  $\alpha$ -Helices.



**Abb. 3 Erythropoetin (Bändermodell)**

(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1BUY>)

Die Aminosäuresequenzen verschiedener Säugetierspezies haben einen verschieden hohen Homologiegrad. Humanes Epo stimmt mit dem des Rhesusaffen zu 91% überein. Bei Hund und Katze wird eine Homologie von 85% erreicht und mit Schwein, Schaf, Maus und Ratte liegt sie zwischen 80 bis 82% (Wen et al. 1993).

Das Epo Molekül besitzt zwei Bindungsstellen für den Erythropoetinrezeptor, je eine mit hoher Affinität und eine mit niedriger Affinität zum Rezeptor.

Die Hauptaufgabe von Erythropoetin besteht in der Regulation der Erythropoese. Diese erfolgt bei adulten Säugetieren im Knochenmark, wo Erythropoetin in erster Linie auf die Vorläuferzellen vom Typ CFU-E wirkt. Eine Aktivierung von Zellen des Typs BFU-E ist zwar möglich, allerdings stellt hier Interleukin-3 den potenteren Wachstumsfaktor dar (Gregory 1976). Bei Embryonen erfolgt die Erythropoese dagegen in der Leber. Die Umstellung erfolgt bei den verschiedenen Spezies zu verschiedenen Zeitpunkten prä- oder postnatal. Während Erythropoetin bei Embryonen hauptsächlich in der Leber von Hepatozyten

gebildet wird, findet die Genexpression in adulten Säugetierspezies vor allem in peritubulären Fibroblasten des Nierenkortex statt (Bachmann et al. 1993; Maxwell et al. 1993) und nur noch zu einem sehr kleinen Teil in Leberzellen. Allerdings kann die Expression des Gens in der Leber durch eine ausgeprägte Anämie auch bei adulten Tieren erneut aktiviert werden. Dabei wurden Epo-Signale in Hepatozyten sowie in den perisinusoidalen Ito-Zellen gefunden (Maxwell et al. 1994; Eckardt 1996).

Beim Schwein erfolgt die Umstellung der Epo-Produktion von der Leber auf die Niere zum Zeitpunkt der Geburt. Für fünf Wochen ist die Konzentration der Epo-mRNA in beiden Organen etwa gleich groß, ab der fünften Lebenswoche ist sie dann in der Niere am größten (David et al. 2002). Beim Menschen beginnt die Umstellung 30 Tage nach der Geburt, allerdings bleibt die Leber für weitere sieben Monate der hauptsächliche Produktionsort für Epo (Dame et al. 1998). Beim Schaf dagegen produziert die Niere bereits in der Fetalperiode den größten Anteil von Erythropoetin (Wintour et al. 1996).

Eine geringe Menge von Epo-mRNA konnte auch im Gehirn, in der Milz, der Lunge und im Hoden sowie im Uterus und in der Plazenta bei Menschen, Mäusen und Ratten nachgewiesen werden, jedoch tragen diese Gewebe wenn überhaupt nur zu einem sehr geringen Teil zur Produktion von Erythropoetin bei (Fandrey und Bunn 1993). David et al. (2001) fanden bei fünf Wochen alten Ferkeln ebenfalls Epo-mRNA in den Hoden; manche Tiere zeigten zusätzlich geringe Konzentrationen in der Milz. Bisher nicht bestätigt werden konnte beim Schwein ein Vorkommen von Epo in Gehirn, Lunge, Lymphknoten, Knochenmark und in den Ovarien.

Die Wirkung von Erythropoetin ist jedoch nicht nur auf die Blutbildung beschränkt. Die Erythropoetin-Rezeptoren finden sich außer auf den erythroiden Vorläuferzellen auch in zahlreichen weiteren Geweben, wie in Neuronen des Gehirns, in Endothelzellen, in Herzmuskelzellen in den Inselzellen des Pankreas, in Nierenzellen und in der Retina (Übersicht in Chateaufieux et al. 2011). Hier wird Erythropoetin ein antiapoptotischer und antiinflammatorischer Effekt nach Traumata oder Gewebeischämie zugesprochen. Dieser entsteht hauptsächlich durch die Regulation pro-inflammatorischer Cytokine, aber auch durch die Verhinderung der Leukozyten-Infiltration (Übersicht in Chateaufieux et al. 2011). Die Erhöhung der Angiogenese bewirkt eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Gewebes, verbessert die Wundheilung und fördert die Bildung von Granulationsgewebe.

Diese Effekte zeigen sich vor allem in der Kardioprotektivität und der Neuroprotektivität von Erythropoetin. Der neuroprotektive Effekt im Gehirn ist jedoch auf das von Astrozyten und Neuronen gebildete Erythropoetin beschränkt, da das Protein nur zu einem sehr geringen Teil in der Lage ist, die Blut-Hirnschranke zu passieren (Juul et al. 2004). Trotzdem zeigt sich auch hier wie schon im peripheren Nervensystem der antiapoptotische und antiinflammatorische Effekt nach Gewebeischämie. Zusätzlich regt Epo auch hier die Vaskularisation der ischämischen Bereiche an und unterstützt die Differenzierung der neuralen Stammzellen zu Astrozyten oder Oligodendrozyten. Hieraus ergibt sich auch die Notwendigkeit des Proteins für die Entwicklung des Gehirns. Tierversuche mit EPO oder EPOR-Knockout-Mäusen führten zu embryonalem Tod, welcher nur zum Teil auf die eingeschränkte Erythropoese zurückzuführen war, sondern auch durch eine Fehlentwicklung des Gehirns bewirkt wurde (Übersicht in Chateauvieux et al. 2011).

Außer den genannten Wirkungen im Organismus scheint Epo eine wundheilungsfördernde Wirkung zu haben. In Tierversuchen konnte dargestellt werden, dass Wunden von mit Epo behandelten Tieren besser und schneller ausheilen als bei Tieren ohne Epo-Behandlung (Übersicht in Sorg et al. 2010).

Bei mit *Salmonella typhimurium* infizierten Mäusen konnte für Epo ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden, indem es an die Epo-Rezeptoren von Makrophagen bindet und dort die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen hemmt (Nairz et al. 2011). Außerdem konnte eine Wirkung auf die B-Zell-Antwort sowie auf dendritische Zellen nachgewiesen werden (Katz et al. 2007; Lifshitz et al. 2009).

## **2.4.2 Das Erythropoetin Gen**

### **2.4.2.1 Aufbau**

Das EPO-Gen befindet sich beim Schwein auf Chromosom 3 p16-p15 (Liu et al. 1998). Es ist 3874 bp lang und besteht aus 5 Exons und den dazugehörigen Introns. Die genomische DNA ist mit der vom Menschen zu 80% und mit der von der Maus zu 73% identisch, im kodierenden wie auch im nicht-kodierenden Bereich (David et al. 2001).

Generell gibt es eine hohe Übereinstimmung in den Gensequenzen des Erythropoetin-Gens zwischen einzelnen Tierarten und dem Menschen und sie werden daher als hochkonserviert angesehen (Shoemaker und Mitsock 1986; Lin 1986; Wen et al. 1993). Dabei beschränkt sich

die Homologie nicht nur auf die Exons und Introns, sondern ist auch in der 5'UTR sowie in der 3'UTR vorhanden (Galson et al. 1993).

Gensequenzen mit einer hohen Übereinstimmung zwischen verschiedenen Spezies werden als orthologe Gene bezeichnet und sind auf ein gemeinsames Ursprungsgen zurückzuführen, das sich bereits vor Aufspaltung der Arten entwickelt hat. Im Laufe der Evolution kommt es durch Mutationen zu einer Änderung in der Nukleotidsequenz. Mit Hilfe der Homologiegrade können Verwandtschaftsbeziehungen identifiziert und phylogenetische Stammbäume entwickelt werden.

Außer den Gensequenzen von Schwein, Maus und Menschen sind auch die des Hausrindes, des Yak, des Schimpansen und des Gorillas bekannt. Von Ratte, Hund, Katze, Schaf, Pferd und Zebu sind in den Datenbanken Einträge über die mRNA des EPO Gens vorhanden. Beim Menschen und beim Affen liegt das Gen auf Chromosom 7, bei der Maus auf Chromosom 5, beim Rind auf Chromosom 25 und beim Hund auf Chromosom 6.

#### **2.4.2.2 Regulation der Erythropetin-Genexpression**

Die Expression des Epo-Gens ist vom Sauerstoffgehalt im Blut und dem Sauerstoffpartialdruck in der Umgebung abhängig. Bereits im Jahr 1890 konnte Viault einen Zusammenhang zwischen der Erythropoese und dem Sauerstoffgehalt des Blutes herstellen, als er nach einer Reise in die peruanischen Berge (über 4500m) einen Anstieg der Erythrozytenzahl im Blut feststellen konnte (Übersicht in Jelkmann 2011). 60 Jahre später erbrachte Reissmann den Beweis, dass ein niedriger Sauerstoffgehalt in der Luft eine durch Epo induzierte Retikulozytose auslöst (REISSMANN 1950). Im weiteren Verlauf der Forschung konnten einige trans-agierende Faktoren, also Proteine, die an die DNA binden können, gefunden werden. Deren Bindungsstellen liegen im Promotorbereich des Gens und sind maßgeblich an der Genexpression unter hypoxischen Zuständen beteiligt.

Unter Promotor versteht man eine DNA-Sequenz, die die Transkription reguliert. Bei Eukaryoten sind diese sehr komplex aufgebaut und man zählt alle Untereinheiten dazu, die für die Transkriptionsinitiation von Bedeutung sind. Der Minimalpromotor ist bei allen Promotortypen enthalten und dient als Bindungsstelle für den Transkriptionsinitiationskomplex. Je nachdem mit welcher Polymerase transkribiert wird, unterscheiden sich die Sequenzen der Promotoren. Im eukaryoten Organismus gibt es drei verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen: Polymerase I transkribiert für Gene der

ribosomalen RNA (rRNA), Polymerase II für proteincodierende Gene, sowie kleine Kern-RNAs und Mikro-RNAs, und Polymerase III codiert für Transfer-RNA (t-RNA).

Klassische minimale Promotoren der RNA-Polymerase II bestehen aus einer TATA-Box (-25-Region) und der Initiatorsequenz (Inr). Viele Promotoren verfügen zusätzlich über eine CAAT-Box, eine GC-Box oder ein Oktamer-Modul. Sie sind an der Basisrate der Transkription beteiligt. Außerdem sind sogenannte Response-Module, die stromaufwärts von Genen liegen und auf allgemeine Signale von außerhalb der Zelle reagieren, sowie zellspezifische Module bekannt. Alternative Promotoren, die meist stromaufwärts des Gens oder in den nicht codierenden Intron-Bereichen liegen, ermöglichen die Bildung von verschiedenen Transkriptvarianten, indem sie das Produkt entweder geringfügig verändern oder verkürzen, so dass verschiedene sich ähnelnde Proteine entstehen können (Brown und Jarosch 2007).

Zum Promotor gehören auch Enhancer und Silencer, die Erkennungssequenzen für DNA-bindende Proteine darstellen. Sie können die Transkription verstärken oder abschwächen. Dabei müssen diese Erkennungsstellen nicht unbedingt in der Nähe des zu transkribierenden Gens liegen, sondern können mehrere Kilobasen davon entfernt sein. Als Haushaltsgene werden Gene bezeichnet, die für Proteine kodieren, die für den Zellstoffwechsel essentiell sind. Sie werden unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert. Ihre Promotoren besitzen keine TATA-Box, sondern bestehen aus GC-reichen Sequenzen.

Der minimale Promotor des Erythropoetin-Gens umfasst 117 bp in 5'-Richtung des Startpunkts der Transkription. Eine TATA-Box ist nicht vorhanden. Die Sequenzen sind sehr GC-reich und ähneln daher den Promotoren von Haushaltsgenen, auch wenn es sich beim EPO-Gen nicht um ein solches handelt. Statt der TATA-Box konnte ein GATA-Motiv identifiziert werden. GATA-2 und GATA-3 wirken negativ regulierend auf die Genexpression (Imagawa et al. 1997), indem sie unter normoxischen Zuständen an das GATA-Motiv binden (Tsuchiya et al. 1997). Unter Hypoxie sinkt der GATA-2 Spiegel (Imagawa et al. 2003), stattdessen bindet vermehrt GATA-4, welches transkriptionsfördernd wirkt (Dame 2003).

Im minimalen Promotor ist ein zweites Segment bekannt, das an der Regulation der Genexpression während hypoxischer Zustände beteiligt ist. Es handelt sich um eine 17 bp lange Sequenz (-61 bis -45 bp) an welche ein hypoxie-assoziiertes Faktor (HAF) bindet, der mit dem 3' Enhancer synergistisch wirkt.

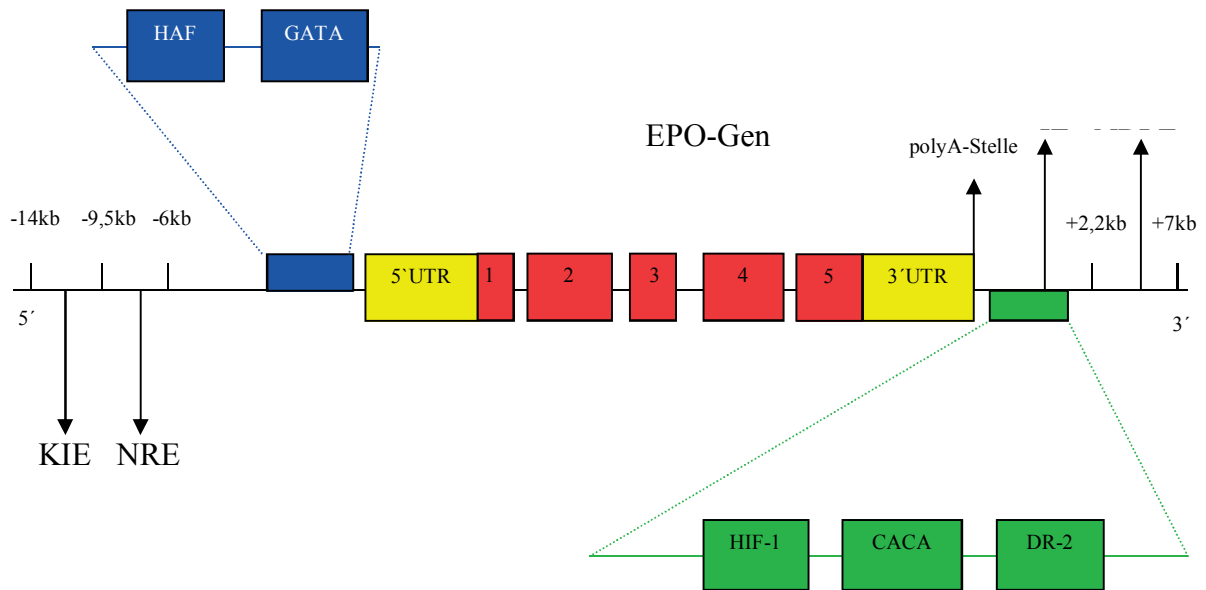
Desweiteren befinden sich im Promotorbereich CpG Inseln. Durch Methylierung von CpG Inseln sinkt die Transkriptionsrate eines Gens. In Epo-produzierenden Zellen ist der Gehalt

der methylierten CpGs deutlich geringer als in den Zellen, die kein Epo produzieren (Wenger et al. 1998; Yin und Blanchard 2000).

Die Repression des Gens kann über zwei Wege erfolgen: Eine hohe Dichte von Methylierungen in der 5' UTR-Region führt zur Bindung eines Methyl-CpG-bindenden Proteins an den Promotor, Methylierung der CpG-Inseln im proximalen Promotor blockiert die Bindung von Kernproteinen an die DNA (Yin und Blanchard 2000).

Weitere Elemente des Promotorkomplexes, die an einer durch Sauerstoffmangel induzierten erhöhten Transkriptionsrate beteiligt sind (hypoxia-response-elements [HRE]), variieren in den Zellen unterschiedlicher Organe. In Leberzellen befindet sich ein transkriptionsinduzierendes Element im Bereich von 0,7 kb 3' des Gens (LIE). In den Nierenzellen liegt ein solches Element zwischen 9,5 kb und 14 kb 5' des Gens (KIE). Ein allgemeines Repressorelement (NRE) konnte in beiden Zelltypen 6 kb 5' des Gens identifiziert werden und in Leberzellen zusätzlich ein Repressorelement im Bereich 2,2 bis 7 kb 3' des Gens (NRLE) (Übersicht in Stockmann und Fandrey 2006).

Der 3' Enhancer des EPO Gens in Leberzellen wurde ausführlich untersucht. Er liegt in einer hochkonservierten Region 120 bp 3' des Poly-A Elements (Beck et al. 1991) und ist 256 bp lang. In seinem 5' Ende liegt eine „TACGTGCT“-Sequenz, welche eine Konsensussequenz für den HIF1 darstellt. 7 bp 3' dieser Sequenz liegt das Motiv CACA. Bisher konnten keine Proteine identifiziert werden, die an diese Region binden, allerdings führen Mutationen in diesem Bereich zu einer beeinträchtigten hypoxischen Geninduktion. Die 3' Stelle des minimalen Enhancers besteht aus zwei Wiederholungen von Steroidrezeptorbindungsstellen, getrennt durch 2 bp (DR-2) (Blanchard et al. 1992). Hier bindet HNF-4 (hepatic nuclear factor-4). Mutationen in diesem Bereich reduzieren ebenfalls die Genexpression.



**Abb. 4 Schematische Darstellung des Erythropoetin-Gens**

(in Anlehnung an Fandrey 2004b)

- Blau minimaler Promotor
- Gelb 5' und 3' UTR
- Rot Exons 1-5
- Grün 3'Enhancer

### 2.4.2.3 Hypoxie-induzierbare Faktoren und ihre Beteiligung an der Transkriptionsrate von Epo

#### 2.4.2.3.1 HIF

Unter den hypoxie-induzierten Faktoren (HIF) versteht man Proteine, die den Sauerstoffgehalt der Zellen regulieren. Sie können u.a. an das HRE (hypoxie-responsive-element) des Epo-Enhancers binden und dadurch die Transkription des Gens fördern. Sie bestehen jeweils aus einer  $\alpha$ -Untereinheit (ca 120 kDa) mit der Isoform 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , oder 3 $\alpha$  und einer  $\beta$ -Untereinheit (91-94 kDa). Nach der  $\alpha$ -Untereinheit werden sie als HIF-1, -2 oder -3 benannt. Beide Untereinheiten werden von den Zellen kontinuierlich gebildet, allerdings ist die  $\alpha$ -Untereinheit bei normalem Sauerstoffgehalt nicht nachweisbar. Katalysiert durch  $\text{Fe}^{2+}$  wird die  $\alpha$ -Untereinheit hydroxyliert, wodurch das Hoppel-Landau-Protein binden kann und das Protein abbaut (Maxwell et al. 1999). Unter Sauerstoffmangel kann die Hydroxylierung nicht stattfinden, das Protein wird stabilisiert und lagert sich mit seiner  $\beta$ -Untereinheit

zusammen, worauf es an den HRE des EPO Enhancers bindet und die Transkription positiv beeinflusst.

HIF-1 wurde 1991 von Semenza und Wang (1992) entdeckt und war damit der erste hypoxie-induzierte Faktor, dessen Beteiligung an der Transkriptionsrate von EPO nachgewiesen werden konnte. Weitere Forschungen ergaben jedoch, dass HIF-2 der wichtigste Transkriptionsfaktor im Zusammenhang mit EPO ist (Scortegagna et al. 2005; Rankin et al. 2007; Kapitsinou et al. 2010). Allerdings wird vermutet, dass es dabei auch alters- und speziesabhängige Unterschiede gibt, die noch weiter untersucht werden müssen.

Neben der Funktion als Transkriptionsfaktor von EPO koordiniert HIF-2 gleichzeitig das Zusammenspiel der Erythropoetinsynthese mit dem Eisenstoffwechsel. HIF-2 ist beteiligt an der Kontrolle des Eisentransporters DMT1 im Dünndarm (Mastrogiannaki et al. 2009) und von Zytochrom b, welches die Redoxreaktion der Eisenionen im Dünndarm katalysiert bevor diese in die Enterozyten aufgenommen werden können (Haase 2013). Unter Hypoxie kommt es bedingt durch HIF-2 zu einer Stimulation der Erythropoetinsynthese in den REPC und in Hepatozyten. Gleichzeitig erhöhen sich im Darm die Anzahl von Redoxreaktionen von  $Fe^{3+}$  zu  $Fe^{2+}$  und die Eisenaufnahme in die Enterozyten. Durch die verstärkte Erythropoese wird die Hpcidinproduktion verringert, was den Effekt ebenfalls weiter verstärkt (Haase 2013).

Gleichzeitig ist die Transkriptionsrate von HIF-2 selbst vom Eisengehalt des Blutes abhängig. Ein in der 5'UTR des HIF-2-Gens lokalisiertes sog. Iron-Regulatory-Element (IRE) bindet Eisen-regulierende Proteine (IRP), welche transkriptionsregulierend auf Gene wirken, die am Eisenstoffwechsel beteiligt sind. Durch die Lokalisation des IRE in der 5'UTR des HIF-2-Gens wird nach Bindung eines IRP die Transkription blockiert (Zimmer et al. 2008).

Das bedeutet, dass eine Synthese von HIF-2 nur bei einem ausreichend hohen Eisenspiegel im Plasma stattfinden kann und erklärt warum sich bei andauerndem Eisenmangel langfristig eine Anämie einstellt.

#### **2.4.2.3.1 HNF-4**

HNF-4 wird hauptsächlich in der Leber, aber auch in der Niere und zu einem kleineren Teil im Magen-Darm-Trakt gebildet. Die Zielgene liegen ebenfalls vor allem in der Leber. Des Weiteren ist dieser Transkriptionsfaktor auch für die Transkription des überwiegend in der Niere exprimierten EPO-Gens von großer Bedeutung.

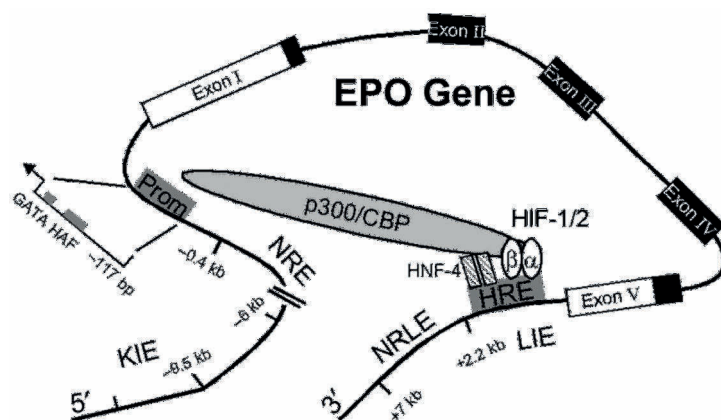
Das Protein gehört zur Gruppe der ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren, d.h. es muss zuerst durch Bindung eines Liganden aktiviert werden. Erst dann ist ein Kontakt mit der Ziel-DNA und einem Co-Aktivatorprotein möglich. Es interagiert beim EPO-Gen mit dem DR2-Element des Enhancers.

Beim Menschen ist HNF-4 $\alpha$  für die Transkription von EPO in der Leber essentiell. Ohne das Protein kann die Produktion in den normalerweise Erythropoetin-produzierenden Zelllinie Hep3B nicht stattfinden (Galson et al. 1995). In neuronalen Zellen konnte jedoch auch in Abwesenheit von HNF-4 $\alpha$  eine EPO-Expression nachgewiesen werden. Bisher ist nicht bekannt, ob ein anderer Faktor dessen Rolle übernimmt (Fandrey 2004a). Inwieweit HNF-4 für die Transkription von EPO in Nierenzellen notwendig ist, ist aufgrund der bisher fehlenden Epo-produzierenden-Nierenzelllinien noch nicht untersucht.

#### 2.4.2.3.2 p300/CBP

Die Proteine p300 und CBP (CREB-binding-protein) gehören zur Gruppe der Histon-Acetyltransferasen. Sie übertragen Acetylgruppen auf Histone, wodurch sich die Chromatinstruktur lockert, so dass die RNA-Polymerase besseren Zugang zur DNA bekommt. Sie spielen bei der Transkriptionsrate von vielen Genen eine große Rolle.

Auch bei der Transkription von Epo wirken sie als Koaktivatoren. Neben der Histon-Acetyltransferaseaktivität vermitteln sie auch den Kontakt zwischen Enhancer und Promotor, indem sie an HIF- $\alpha$  (Arany et al. 1996) und HNF-4 sowie den Promotor binden. Dabei wird die Acetyltransferaseaktivität durch die Bindung sogar noch verstärkt und die Transkriptionsrate noch weiter gesteigert (Soutoglou et al. 2001).



**Abb. 5** Schematische Darstellung der Bindungsstellen von Hypoxie-induzierten Faktoren

Quelle: (Garst und Batey 2009)

#### **2.4.2.4 Genetische Variabilität im EPO-Gen des Schweins**

Obwohl die Gensequenzen für Erythropoetin beim Schwein und einigen anderen Haustieren bekannt sind, gibt es kaum Informationen über die Variabilität derer EPO-Gene. Auch über den Einfluss von Mutationen im EPO-Gen auf die Blutbildung ist nur wenig bekannt. Bei Mensch und Maus sind zwar einige SNPs im EPO-Gen identifiziert worden, deren genaue Funktionen sind jedoch meist nicht geklärt. Ein SNP in der Promotorregion 1125 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt des EPO-Gens des Menschen korreliert signifikant mit der Erythropoetinkonzentration. Das Vorhandensein eines T-Allels führt zu einer 7,5 mal höheren Epo-Konzentration im Gegensatz zum Allel G. Die Allele C und A oder eine Deletion an dieser Position führen ebenfalls zu verminderter Promotoraktivität (Tong et al. 2008). Der Genotyp G/G in diesem SNP steht in Korrelation mit dem Auftreten eines Myelodysplastischen Syndroms (Ma et al. 2010). Die erhöhte Promotoraktivität durch das T-Allel kommt dadurch zu Stande, dass sich bei Vorhandensein dieses Allels eine neue Bindungsstelle für die Proteine EVI1/MEL1 oder AP1 ausbildet (Tong et al. 2008).

Ob beim Schwein SNPs im EPO-Gen vorhanden sind, die mit Parametern des roten Blutbilds korrelieren, ist bisher nicht bekannt. Es ist auch nicht geklärt, ob wie beim Menschen Bindungsstellen für die Proteine EVI1/MEL1 oder AP1 existieren und ob diese einen Einfluss auf die Genaktivität beim Schwein haben. Die hier vorliegende Arbeit soll nun einen Beitrag dazu leisten, das EPO-Gen des Schweins näher zu identifizieren und mögliche SNPs und deren Einfluss auf das rote Blutbild zu ermitteln.

## 2.5 Erythropoetin–Rezeptor

### 2.5.1 Aufbau des Rezeptors

Beim Epo-Rezeptor des Schweins handelt es sich um ein 509 Aminosäuren langes Glykoprotein (Pearson et al. 2000). Er gehört zur Familie der Klasse 1 Zytokinrezeptoren, zu denen auch die Rezeptoren verschiedener Interleukine, Wachstumsfaktoren und der Prolaktin-Rezeptor gehören (Bazan 1989).



**Abb. 6 Extrazelluläre Domäne des Epo-Rezeptor mit gebundenem Epo**

(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1CN4>)

rot/braun: antiparallele Helices von Erythropoetin

blau/grün/gelb: extrazelluläre Domänen des Epo-Rezeptors

Charakteristisch für Zytokinrezeptoren ist der Aufbau aus zwei oder mehr immunglobulin-ähnlichen Domänen, vier gleich angeordneten Cystein-Resten und einem extrazellulären, nahe der Transmembrandomäne liegenden Motiv, bestehend aus Trp-Ser-C-Trp-Ser (WSXWS). X steht dabei für eine beliebige Aminosäure (Bazan 1989). Dieses Motiv scheint für die Expressierung des Rezeptors und Bindung des Liganden essentiell zu sein. Zellen mit einer Mutation in diesem Bereich exprimieren sehr wenige oder überhaupt keine Epo-Rezeptoren an ihrer Oberfläche und sind auch bei Anwesenheit von Epo nicht zu einer Differenzierung befähigt (Yoshimura et al. 1992). Quelle et al. (1992) konnten Mutationen im WSXWS-Motiv finden, die zu einer geringeren Affinität zum Liganden führen.

Die extrazellulären Domänen des ungebundenen Rezeptors liegen als Dimere vor (Livnah 1999; Remy et al. 1999). Nach Anlagerung des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung dieser extrazellulären Domänen, so dass diese miteinander in Kontakt treten und zwei Janus-Kinase-2 Moleküle, die nahe der Transmembranregion auf der

intrazellulären Seite liegen, aktiviert werden (Witthuhn et al. 1993). Im zweiten Schritt werden acht Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert (Miura et al. 1991), so dass mehrere Bindungsstellen (SH2) für verschiedene intrazelluläre Proteine entstehen und zahlreiche Signalkaskaden in Gang gesetzt werden können.

## **2.5.2 Signaltransduktion**

### **2.5.2.1 Janus-Kinase-STAT-Signalweg**

Einen möglichen Signalweg stellt der Janus-Kinase-STAT-Signalweg dar. An die Tyrosinreste des Epo-Rezeptors können STAT5 oder STAT3 binden. STAT1 dagegen wird direkt über die Janus-Kinase aktiviert und assoziiert nicht mit einem Tyrosinrest. Die STAT-Moleküle werden nach Bindung an den Rezeptor ebenfalls von der Janus-Kinase phosphoryliert, so dass auf ihrer Oberfläche weitere SH2-Bindungsstellen entstehen. Über diese können sich die vom Rezeptor gelösten STAT zu Dimeren zusammenlagern, was zu ihrer Aktivierung führt. Diese aktivierten Moleküle können nun in den Zellkern einwandern und dort den Promotor der Zielgene aktivieren (Übersicht in Richmond et al. 2005).

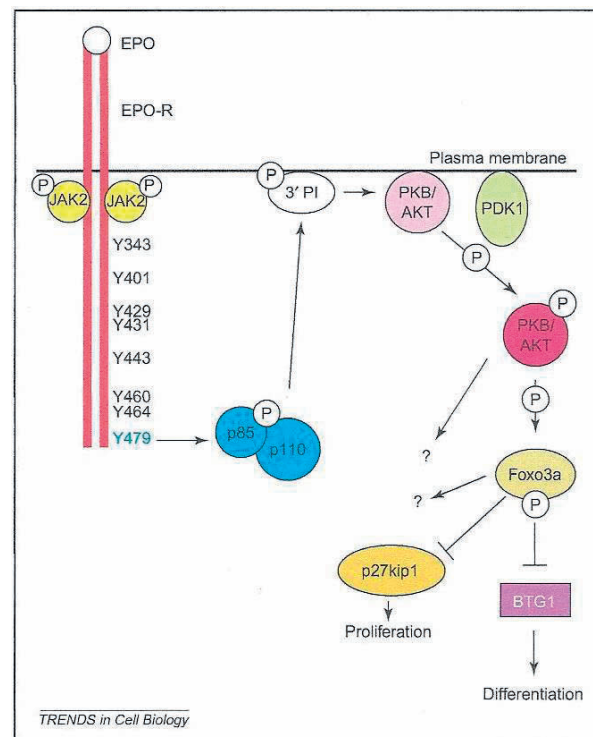
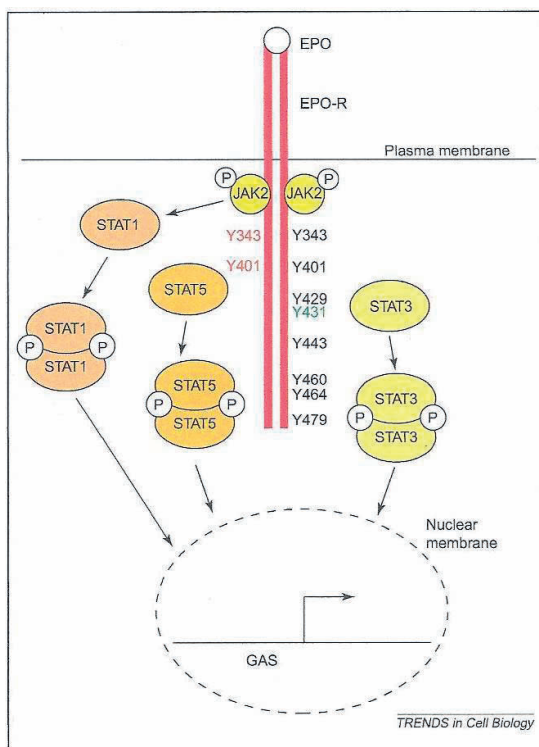
### **2.5.2.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg**

Eine zweite Möglichkeit der Signalübertragung stellt der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg dar. Die p85 Untereinheit der PI-3-Kinase kann über die Tyrosinreste an den Epo-Rezeptor binden (Miura et al. 1994a; Damen et al. 1995). Durch die Aktivierung der Kinase wird nun eine Signalkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende der Transkriptionsfaktor Foxo3a steht. Foxo3a stellt einen Transkriptionsfaktor für verschiedene Zielgene dar, deren Aktivierung eine proapoptische und antiproliferative Funktion in der Zelle haben.

Zusätzlich wird durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg der Transkriptionsfaktor GATA-1, der ebenfalls eine große Rolle in der Regulation spezifischer, für die Erythropoese notwendiger Gene spielt, phosphoryliert und so aktiviert (Zhao et al. 2006). Zielgene für GATA-1 stellen unter anderem das Erythropoetin-Rezeptor-Gen (Youssofian et al. 1990) und das b-Globin-Gen dar (Wall et al. 1988). Bei beiden Genen führt der Transkriptionsfaktor zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate. Es kommt zu einer vermehrten Bildung des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin und zu einer gesteigerten Expression von Epo-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Beim Menschen erhöht sich gleichzeitig die Transkriptionsrate von SCL

(Cheung und Miller 2001) einem Transkriptionsfaktor, der ebenfalls an das EPOR-Gen bindet und zu einer Aktivierung des Gens führt.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Aktivierung des PI-3-Signalwegs zu einer Proliferation und Differenzierung der Zellen führt und wesentlich dazu beiträgt, die Apoptose der Zellen zu verhindern. Dabei ist die PI-3-Kinase zwar notwendig, alleine jedoch nicht ausreichend zur Verhinderung der Apoptose bei erythroiden Vorläuferzellen (Bao et al. 1999). Mäuse mit fehlender Expression der p85  $\alpha$ -Untereinheit zeigen eine deutliche Verminderung der Bildung von CFU-E und BFU-E (Huddleston 2003).



**Abb. 7 Janus-Kinase-STAT-Signalweg** **Abb. 8 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg**

Quelle: (Richmond et al. 2005)

### 2.5.2.3 MAP-Kinase-Signalweg

Die dritte Möglichkeit der Signalübertragung stellt der MAP-Kinase-Signalweg dar (Miura et al. 1994b). Über mehrere Signalwege kann durch die Phosphorylierung der SH2-Domänen am Epo-Rezeptor das Protein RAS (Rat Sarcoma) aktiviert werden. Über das Protein RAF-1 (Rat Fibrosarcoma 1) kommt es nun zur Aktivierung einer MAP-Kinase. MAP-Kinasen können im Zellkern die Transkription verschiedener Gene induzieren, u.a. die der DNA-

bindenden Regulatorproteine c-MYC, c-FOS und c-JUN (Übersicht in Cheung und Miller 2001), die wiederum die Transkriptionsrate anderer Gene erhöhen. Außerdem hemmt die MAP-Kinase das Protein Caspase 3, welches ebenfalls eine große Rolle bei der Apoptose von Zellen spielt.

Klingmüller et al. (1997) konnten beweisen, dass eine Aktivierung der MAP-Kinase ohne Beteiligung von RAS und RAF-1 möglich ist. Hierbei spielt Phosphatidylinositol-3 ebenfalls eine große Rolle.

#### **2.5.2.4 Intrazellulärer $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom**

Eine weitere Möglichkeit in der Signalübertragung stellt der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom dar. Kultivierte humane Erythroblasten zeigen innerhalb weniger Minuten nach Stimulation mit Epo einen Anstieg des intrazellulären Kalziumgehaltes (Miller et al. 1988). Weitere Untersuchungen ergaben, dass der Kalziumgehalt im Nukleus sogar um bis zum dreifachen ansteigt (Yelamarty et al. 1990). Über seine SH2-Domänen kann das Enzym Phospholipase C  $\gamma$  an die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors binden (Ren et al. 1994). Über eine Signalkaskade wird Proteinkinase C aktiviert, welche einen intrazellulären Kalziumeinstrom induziert.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind am Zellstoffwechsel beteiligt, indem sie selbst Enzyme aktivieren oder hemmen; z.B. reagiert der an den Epo-Promotor bindende p300/CBP- Komplex auf Kalzium (Brown, 2007), und es können auch über Calmodulin zahlreiche weitere Enzyme aktiviert werden. Außerdem können durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kalzium-bindende Proteine in die Zelle gelangen, wodurch ebenfalls weitere Stoffwechselwege in Gang gebracht werden.

### **2.5.3 Das Erythropoetin-Rezeptor Gen**

#### **2.5.3.1 Aufbau**

Das Erythropoetin-Rezeptor-Gen des Schweins liegt auf Chromosom 2 (Fahrenkrug et al. 2000) und besteht aus 8 Exons und 7 Introns. Außer beim Schwein sind auch die EPOR-Gene vom Menschen, der Maus und der Ratte bekannt. Von Hund, Rind und Schaf konnte die mRNA in der Datenbank NCBI gefunden werden. Beim Menschen und Affen liegt das Gen auf Chromosom 19, bei der Maus auf Chromosom 9, bei der Ratte auf Chromosom 8, beim Rind auf Chromosom 7 und beim Hund auf Chromosom 20.

Wie auch beim EPO-Gen weist die EPOR-Sequenz einen hohen Homologiegrad zwischen den Säugetieren und dem Menschen auf. Die Übereinstimmung zwischen dem humanen

EPOR-Gen und dem murinen beträgt 82% (Jones et al. 1990). Pearson et al. fanden beim Vergleich der Gensequenzen von Schwein, Maus, Mensch und Ratte eine Übereinstimmung von 79-85%. Alle funktionellen Bereiche des Rezeptors sind zu 100% konserviert. 159 Nukleotide der 5'UTR und 154 Nukleotide der 3'UTR-Region waren mit humanem EPOR zu 91%, bzw. 71% identisch (Pearson et al. 2000).

Kuramochi et al. konnten beim EPOR der Maus zwei verschiedene cDNAs identifizieren, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die cDNA codiert entweder für einen 55.000 M membrangebundenen Rezeptor oder einen 29.000 M Rezeptor, dem die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Domäne fehlen (Kuramochi et al. 1990). Beim membrangebundenen Rezeptor wird die Transmembrandomäne von Exon 6 codiert, die zytoplasmatische Domäne von den Exons 7 und 8 (Youssofian et al. 1990). Der alternative Rezeptor wird sezerniert, wie es auch bei vielen anderen Zytokinrezeptoren, insbesondere IL-4 und IL-7, der Fall ist (Mosley et al. 1989; Goodwin 1990).

Zwei Jahre später konnten Kazuo et al. das Vorkommen des löslichen Rezeptors auch beim Menschen bestätigen (Kazuo et al. 1991). Seine genaue Funktion ist bisher nicht bekannt. Allerdings wird davon ausgegangen, dass er an der Differenzierung der erythroiden Vorläuferzellen beteiligt ist (Nakamura et al. 1996). Ob diese Form des Rezeptors auch beim Schwein vorkommt, ist ebenfalls noch nicht geklärt.

### **2.5.3.2 Regulation der Genexpression**

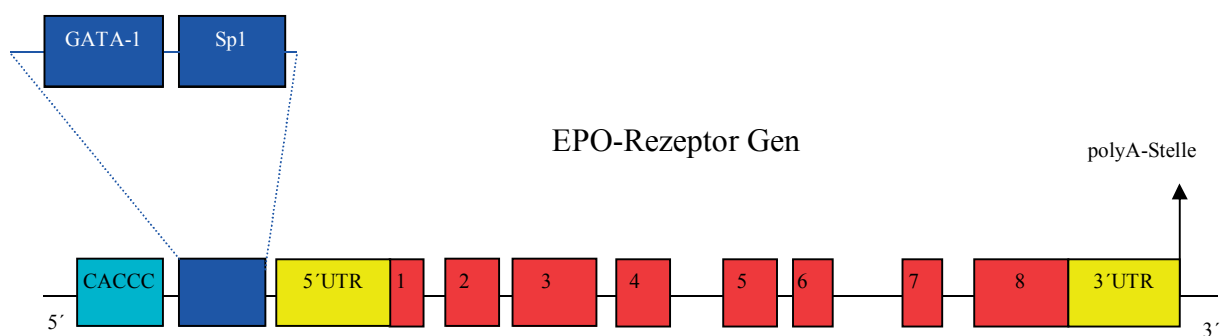
Der EPOR-Promotor besteht zu ca. 55% aus GC-Regionen und hat damit relativ geringe Anteile von Guanin und Cytosin im Vergleich zu anderen Cytokinrezeptoren (Youssofian et al. 1990). Eine TATA-Box oder CAAT-Box ist nicht vorhanden. Jedoch konnten Bindungsstellen für GATA-1 oder Sp1 identifiziert werden (Youssofian et al. 1990; Penny und Forget 1991; Noguchi et al. 1991; Maouche et al. 1991). GATA-1 und Sp1 sind Transkriptionsfaktoren, die miteinander kooperieren. Beide Bindungsstellen sind für die Genaktivierung essentiell. Hohe GATA-1-Konzentrationen sind sogar in der Lage eine Transkription des EPOR-Gens in Zellen, die normalerweise keine Epo-Rezeptoren exprimieren, einzuleiten (Zon et al. 1991). Mutationen im Sp1-Motiv führen zu einer deutlich verminderten Promotoraktivität (Chin et al. 1995).

Sowohl bei der Maus als auch beim Menschen liegt jeweils ein GATA-1 und ein Sp1-Motiv ca. 150 bp proximal des Transkriptionsstartpunkts. Sie liegen hintereinander in einem Abstand von 22 bp bzw. 27 bp (Youssofian et al. 1990; Penny und Forget 1991; Noguchi et

al. 1991). Dieser Bereich übernimmt die Funktion eines proximalen Promotors und ist damit von größter Bedeutung. Weitere GATA-1 Bindungsstellen finden sich auch im 5'UTR- und 3'UTR-Bereich, sowie je eine Bindungsstelle in Exon 3 und eine im vierten Intron (Kuramochi et al. 1990).

Des Weiteren konnten bei beiden Spezies im Promotorbereich des Gens drei CACCC-Motive gefunden werden (Youssofian et al. 1990; Noguchi et al. 1991). CACCC-Motive sind potentielle Bindungsstellen für Krüppel-like-Faktoren, die als Transkriptionsfaktoren dienen können. Charakteristisch für den humanen EPOR ist, dass die CACCC-Motive weiter proximal liegen als bei der Maus (Noguchi et al. 1991).

Maouche et al. konnten beim Menschen zusätzlich mehrere potentielle Bindungsstellen für Helix-Loop-Helix- (HLH-) Proteine mit der Konsensussequenz „CANNTG“ detektieren (Maouche et al. 1994). Diese Bindungsstellen werden auch E-Boxen genannt. An ihnen kann beim Menschen der Transkriptionsfaktor SCL/TAL1 binden. Wie Rogers et al. (2012) beweisen konnten, ist auch dieser Faktor in der Lage die Transkription von EPOR positiv zu beeinflussen. Die experimentell herbeigeführte vermehrte Expression von SCL/TAL1 führt zu einer erhöhten Transkription des EPOR und ermöglicht damit die weitere Differenzierung der erythroiden Vorläuferzellen. Mutationen der E-Box können zu einer verminderten Genaktivität führen (Rogers et al. 2012). Außerdem ist SCL/TAL1 an der Bindung des Transkriptionsaktivierungskomplexes an den Transkriptionsstartpunkt beteiligt (Rogers et al. 2012).



**Abb. 9** Allgemeine schematische Darstellung des Epo-Rezeptor Gens

Türkis	CACCC-Motive
Blau	Proximaler Promotor mit Bindungsstellen für GATA-1- und Sp1
Gelb	5' und 3' UTR-Region
Rot:	Exon 1-7

### **2.5.3.3 Transkriptionsfaktoren mit Beteiligung an der Transkription von EPOR**

#### **2.5.3.3.1 GATA-Transkriptionsfaktoren**

Die Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren umfasst zwei Untergruppen. GATA-1, GATA-2 und GATA-3 üben spezifische Funktionen bei der Hämatopoese aus und stellen die erste Untergruppe dar. Der wichtigste Faktor für die Entwicklung der Erythrozyten ist GATA-1. Die bereits am längsten bekannte Funktion dieses Transkriptionsfaktors ist die Aktivierung des  $\beta$ -Globin-Gens und damit die Beteiligung an der Bildung des Hämoglobins (Evans et al. 1988; Wall et al. 1988). Bei der Aktivierung des Erythropoetin-Rezeptor-Gens und der damit verbundenen Expression des Rezeptors auf der Oberfläche von erythroiden Vorläuferzellen spielt GATA-1 ebenfalls eine wichtige Rolle (Zon et al. 1991). Zellmutanten, die nicht zu einer GATA-1 Expression befähigt sind, sind nicht in der Lage sich zu ausgereiften Erythrozyten zu differenzieren (Pevny et al. 1991).

Die zweite Untergruppe besteht aus GATA-4, GATA-5 und GATA-6. Sie werden vorwiegend in Geweben mesodermalen und endodermalen Ursprungs wie Herz, Leber, Lunge, Darm und Gonaden exprimiert und sind dort an der gewebespezifischen Genregulation beteiligt (Übersicht bei Molkentin 2000).

Allen GATA-Transkriptionsfaktoren gemeinsam ist ihre Interaktion mit der Ziel-DNA über ihre Zinkfinger-Domänen. Bei einem Zinkfinger handelt es sich um eine Struktur eines Proteins, bei dem die Peptidkette in Schleifenform koordinativ an ein zentrales Zinkion gebunden ist. Diese Struktur findet sich in sehr vielen eukaryonten Transkriptionsfaktoren aber auch in Steroidrezeptoren.

Insgesamt gibt es mindestens sechs verschiedene Formen von Zinkfingern. Der wichtigste Finger stellt der Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub>-Finger dar. Er besteht aus einer Abfolge von etwa 12 Aminosäuren und enthält im Innern jeweils zwei Cystein- und zwei Histidinreste. Der Finger ragt über die Oberfläche des Proteins heraus und kann an mit Hilfe seiner Kontaktstellen an der großen Furche der DNA binden. Wechselwirkungen zwischen der  $\beta$ -Faltblattstruktur und den Zucker-Phosphat-Resten der DNA stabilisieren die Bindung (Brown und Jarosch 2007).

Dabei ist es möglich, dass ein Zinkfinger-Protein nicht nur einen dieser Finger auf seiner Oberfläche besitzt, sondern sie können multipel auftreten. Meist ist die Bindung an die DNA über einen Zinkfinger unabhängig von evtl. vorhandenen anderen. Es sind allerdings auch Fälle bekannt, bei denen die Finger miteinander in Wechselbeziehung treten, wie z.B. bei den Steroidrezeptoren (Brown und Jarosch 2007).

Der wichtigste GATA-Faktor im Zusammenhang mit der Regulation des Epo-Rezeptors ist GATA-1 (Zon et al. 1991). Bis zum Jahr 1990 gab es für dieses Protein unterschiedliche

Bezeichnungen (Eryf-1, NF-E1 und GF-1 für GATA-1), die seitdem unter dem Namen GATA-1 zusammengefasst werden (Orkin 1990). Die Konsensussequenz aller GATA-Transkriptionsfaktoren lautet „T/A-GATA-G/A“ (Evans 1988; Wall et al. 1988). Allerdings können die Faktoren auch abgewandelte Sequenzmotive wie „GATT“ oder „GATC“ mit unterschiedlicher Präferenz binden. Dies ermöglicht eine gezielte Genregulation in Geweben, die mehrere GATA-Faktoren exprimieren (Ko und Engel 1993; Merika und Orkin 1993).

GATA-Proteine besitzen auf ihrer Oberfläche je zwei Zinkfinger jeweils vom Typ Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub>. Die Aminosäuren-Abfolge ist bei beiden Fingern Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys (Tsai et al. 1988; Evans und Felsenfeld 1989). Allerdings besitzen sie unterschiedliche Funktionen im Zusammenhang mit der Bindung an die Ziel-DNA. Über den N-terminalen Zinkfinger (N-Finger) wird die DNA-Sequenz spezifisch erkannt und die Stabilität der Bindung erhöht (Martin und Orkin 1990; Yang und Evans 1992). Außerdem spielt der N-Finger eine große Rolle im Zusammenhang mit Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren, wie z.B. dem Kofaktor FOG (friend-of-GATA) (Tsang et al. 1997). Der C-terminale Zinkfinger (C-Finger) ist zwar ebenfalls an der Bindung an die Ziel-DNA beteiligt (Martin und Orkin 1990; Yang und Evans 1992); allerdings interagiert er mit anderen Transkriptionsfaktoren. Bekannt sind Wechselbeziehung mit Proteinen aus der Krüppel-like-Familie, wie z.B. Sp1 oder EKLF (Merika und Orkin 1995).

#### **2.5.3.3.2 Sp1**

Der Transkriptionsfaktor Sp1, auch Spezifisches Protein 1 genannt, wurde zuerst beim Menschen im Zusammenhang mit der Transkription von SV-40 Virusgenomen identifiziert (Dyran und Tjian 1983). Das Virus SV-40 (Simian Virus 40 / Affenvirus 40) gehört zur Gattung der Polyomaviren, dessen natürlicher Wirt der Rhesusaffe ist. Eine Infektion bleibt bei ihm symptomlos. Bei experimentell infizierten neugeborenen Hamstern treten jedoch bestimmte Tumore, v.a. Sarkome, gehäuft auf (Giardi A. J. 1962; Diamandopoulos 1972). Auch beim Menschen ist eine Infektion mit dem Virus bekannt, allerdings ist hier nicht eindeutig geklärt, ob eine Infektion auch zur Ausbildung von Krankheitssymptomen führt. Da die Virus-DNA in verschiedenen Tumoren, z.B. bei Lymphomen (Butel et al. 2003), dem Osteosarkom (Mendoza et al. 1998; Heinsohn et al. 2009) oder dem Mesotheliom (Gibbs et al. 1998; Rizzo et al. 1998) nachgewiesen werden konnte, wird darüber diskutiert, ob auch hier ein Zusammenhang zwischen SV-40 Infektionen und der Entstehung dieser Krebsarten besteht (Nelson 2001).

Anfangs wurde angenommen, dass Sp1 spezifisch für die Aktivierung von SV-40 ist. Diese Hypothese musste allerdings revidiert werden, als auch im Zusammenhang mit anderen Promotoren Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor gefunden wurden. Das spezifische Bindungselement stellen GC-Boxen mit einer Sequenz von „GGGCGG“ dar (Dyanan und Tjian 1983). Der SV-40 Promotor wird direkt über das Protein Sp1 gesteuert, während bei anderen Genen weitere Regulationselemente an der Aktivierung beteiligt sein können. Außerdem sind Gene bekannt, die mehrere Sp1-Bindungsstellen aufweisen, die allerdings nicht alle das Protein mit gleicher Effektivität binden. Hier sind ebenfalls weitere DNA-Sequenzen an der Aktivierung beteiligt (Dyanan und Tjian 1985).

Das humane Sp1 Protein besteht aus 785 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 81 kDa auf (<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=1312>). Charakteristisch ist auch bei diesem Transkriptionsfaktor die Bindung über eine Zinkfinger-Domäne. Diese ist wie bei den meisten Zinkfinger-Proteinen vom Typ Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub>.

Auch beim Schwein ist ein Sp1 Transkriptionsfaktor bekannt. Er besteht aus 786 Aminosäuren und hat ebenfalls ein Molekulargewicht von 81 kDa. Das zugehörige Gen liegt auf Chromosom 5, ist 2638 bp lang und besteht aus 6 codierenden Exons ([http://www.ensembl.org/Sus\\_scrofa/Gene/Summary?db=core;g=ENSSSCG00000000272;r=5:19024788-19065851;t=ENSSSCT00000000291](http://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Gene/Summary?db=core;g=ENSSSCG00000000272;r=5:19024788-19065851;t=ENSSSCT00000000291)).

Sowohl die Nukleotidsequenz des Gens als auch die Aminosäuresequenz des Moleküls stimmen zu einem großen Teil mit den Sequenzen des Menschen überein (Simmen et al. 2000).

Es sind heute zahlreiche Gene bekannt, an deren Aktivierung Sp1 beteiligt ist. Beispiele für Gene des Schweins, die Sp1-Bindungsstellen in ihrer Promotorregion aufweisen, sind z.B. das Caveolin-1-Gen, das Dopamin-Rezeptor-Gen oder auch Gene für CREB-Proteine. Außerdem scheint der Transkriptionsfaktor in der frühen Gravidität eine große Rolle zu spielen.

### 2.5.3.3.3 SCL/TAL1

Der Transkriptionsfaktor SCL, auch TAL1 (*T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia Protein 1*) genannt, spielt als Wachstumsfaktor bei der Erythropoese des Menschen eine wichtige Rolle (Aplan et al. 1992). Er ist an der Spezifizierung und Differenzierung der Vorläuferzellen beteiligt. Vor allem in der embryonalen Entwicklung ist er essentiell. Knock-out Mäuse des Genotyps *scl-/scl-* sind nicht zur Erythropoese befähigt und sterben bereits im Embryonalstadium ab (Robb et al. 1995).

TAL1 wird er auch deshalb genannt, weil er bei der Entstehung von akuter lymphoblastischer T-Zell-Leukämie in bis zu 60% der Fälle beteiligt ist (Ferrando 2004) Normalerweise wird das Gen für SCL in T-Zellen jedoch nicht exprimiert. SCL/TAL1 ist physiologisch spezifisch für die erythroide und myeloide Zellreihe.

Im Gegensatz zu GATA oder Sp1 gehört SCL/TAL1 nicht zu den Zinkfinger-Proteinen sondern ist ein Transkriptionsfaktor, der über ein sog. Helix-Loop-Helix-Motiv an die Ziel-DNA bindet. Die Erkennungssequenz stellt die sog. E-Box dar, deren Konsensussequenz „CANNTG“ ist (Murre et al. 1994).

#### **2.5.3.4 Genetische Variabilität im EPOR-Gen beim Schwein**

Im Epo-Rezeptor-Gen des Schweins sind bereits mehrere SNPs bekannt. Schon im Jahr 2005 konnten Vallet et al. (2005) in Intron 4 (g.2373C>T, Gen Bank Ass. No. EU407778) einen SNP detektieren, der zu einem Basenaustausch von Cytosin zu Thymin führt und eine zusätzliche Bindungsstelle für GATA-1 hervorruft. Die Ausprägung eines T-Allels führt zu einer erhöhten Uteruskapazität bei Sauen (Vallet et al. 2005).

Zhang et al. konnten 2011 sieben weitere SNPs identifizieren. Vier SNPs liegen in den Intronbereichen (g.705G>T in Intron 1 und g.2882C>T, g.3035A>G, g.3132A>T in Intron 6; Namensgebung anhand GenBank Ass. No. EU407778) und 3 SNPs liegen in den Exons; c.310C>G in Exon 2, c.434A>G in Exon 3 und c.1551C>T in Exon 8 (ZHANG et al. 2011a; ZHANG et al. 2011b). Der bereits bekannte SNP in Intron 4, g.2373C>T konnte bestätigt werden (ZHANG et al. 2011b). SNP g.705G>T korreliert signifikant mit der Wurfgröße. Tiere mit Genotyp GG weisen höhere Ferkelzahlen und eine höhere Anzahl lebend geborener Ferkel als Tiere mit Genotyp TT auf. Die SNPs g.2882C>T und g. 3035A>G korrelieren mit der Ferkelzahl und der Anzahl lebend geborener Ferkel (ZHANG et al. 2011b). Die Mutation an Position c.434A>G bewirkt einen Basenaustausch von Histidin zu Arginin und assoziiert mit einer größeren Uterusgröße bei Sauen. Das G-Allel kommt bei chinesischen Schweinerassen deutlich häufiger vor als bei den europäischen Schweinerassen. (ZHANG et al. 2011a).

SNPs des Epo-Rezeptor-Gens, die im Zusammenhang mit der Blutbildung stehen, sind allerdings bisher nicht bekannt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

#### 3.1.1 F2-Schweinepopulation

Wie schon in den Dissertationen von Hepp 2006, Berge 2008 und Clemens 2010 wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit ein Tierkollektiv untersucht, das aus einer informativen F2-Familie mit den Ausgangsrassen Meishan und Pietrain besteht. Die Population war bereits im Vorfeld am Institut für Tierzüchtung und Biotechnologie der Universität Hohenheim in Stuttgart erstellt worden. Als Elterntiere dienten vier reinrassige Pietrain-Eber und vier reinrassige Meishan-Sauen, zwei Schweinerassen, die sich sowohl genetisch als auch phänotypisch deutlich voneinander unterscheiden. Die Erstellung der F2-Generation erfolgte über eine Kreuzung von 5 Ebern mit 13 Sauen aus der F1-Familie. Die Tiere waren unter einheitlichen Bedingungen auf der Versuchsstation der Universität Hohenheim aufgezogen worden (Hepp 2006).

Die Tiere wurden im Alter von 8-12 Wochen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 27 kg in die Ställe der Klinik für Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen eingestallt. Insgesamt entstanden 21 Gruppen, die in ihrer Tierzahl je nach Wurfgröße zwischen 5 und 11 variierten.

Ab dem Tag ihrer Ankunft wurden die Tiere über sechs bis neun Tage mit Fütterungsantibiotika (Tiamulin (0,2 g/kg Futter) und Chlortetrazyklin (1 g/kg Futter)) versorgt. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit pelletiertem Mastfutter über Trockenfutterautomaten. Der Energiegehalt des Futters entsprach 12,6 MJ/kg. Wasser wurde ebenfalls ad libitum über Nippeltränken oder Tröge angeboten.

Nach einer zwei-wöchigen Eingewöhnungszeit erfolgte eine orale Verabreichung von 50.000 Sporozysten von *S. miescheriana* je Tier (Genehmigung durch Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießen, AZ: GI 18/15-Nr.43/2001 vom 17.12.2001). Die Infektionsstadien waren zuvor am Institut für Parasitologie der Universität Leipzig erstellt worden.

Nach der Infektion wurden wöchentlich klinische Parameter wie Atemfrequenz, Herzfrequenz und die Rektaltemperatur ermittelt und das Allgemeinbefinden bewertet. An den Versuchstagen 0 (d0), 14 (d14), 28 (d28) und 42 (d42) wurden von jedem Versuchstier

Blutproben entnommen und verschiedene klinisch-chemische Parameter untersucht. Die absoluten Erythrozytenzahlen, der Hämatokritwert und der Hämoglobingehalt, sowie die mittlere Hämoglobinkonzentration (MCHC) wurden aus dem EDTA-Vollblut elektronisch mit Hilfe des Cellcounters F-800 (Fa. Sysmex, Langenfeld) ermittelt. Anhand eines Blutausstriches wurde auch das Ausmaß an Polychromasie, Poikilozytose und Anisozytose der Erythrozyten und das Vorhandensein von Jollykörpern untersucht.

Nach der Euthanasie am Tag 70 des Versuchszeitraums wurden die Tiere zur Sektion in das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verbracht.

**Tabelle 3 Tierzahlen und Aufbau der F<sub>2</sub>-Familie**

Generation	Pietrain x Meishan		n
	#Eber	#Sauen	
F <sub>0</sub>	4	4	8
F <sub>1</sub>	5	13	18
F <sub>2</sub>	68	71	139

Einzelheiten über den Versuchsablauf, die klinische Überwachung und die parasitologischen Untersuchungen sind im Detail in der Dissertationsschrift von (Hepp 2006) dargestellt.

Als Probenmaterial für einen Teil der Versuche diente das genetische Material, das bereits von Berge (2008) im Rahmen seiner Dissertation isoliert worden war.

### 3.1.2 Kommerzielle Schweinepopulation

Das Probenmaterial der kommerziellen Schweinepopulation bestand aus insgesamt 109 EDTA-Blutproben von Sauen aus Herdbuchzuchtbetrieben aus dem süddeutschen Raum. Davon waren 59 dieser Blutproben bereits im September und Oktober 2009 von den Mitarbeitern des Schweinegesundheitsdienstes Baden-Württemberg, Fellbach, entnommen und nach Gießen verbracht worden. Eine weitere Probenentnahme mit insgesamt 50 EDTA-Blutproben erfolgte im Jahr 2012. Von den insgesamt 109 gewonnenen Blutproben wurden für die Assoziationsstudie 90 Proben eingesetzt. Blutproben, die Anzeichen von Blutgerinnung aufwiesen wurden aussortiert. Ein Probenröhrchen wurde beim Transport beschädigt und konnte daher ebenfalls nicht verwendet werden.

## 3.2 Material

### 3.2.1 Geräte und Labormaterial

Thermocycler:	T-Gradient, Whatman Biometra, Göttingen T-Personal, Whatman Biometra, Göttingen
Photometer:	Ultrospec 1100pro, Amersham Biosciences, Freiburg NanoDrop 2000C Spectrometer, peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zentrifugen:	Biofuge fresco, Heraeus, Osterode Micro Centrifuge SD 220, Roth, Karlsruhe
Pipetten:	Biohit GmbH, Rosbach v. d. Höhe Roth, Karlsruhe
Bildanalysestystem:	BioDocAnalyze, Biometra, Göttingen
Mikrowelle:	HF 1210, Siemens, München
Elektrophoresekammer:	Horizon 58, Biometra, Göttingen
Pyrosequencer:	Pyromark ID, Quiagen, Hilden
Magnetschüttler:	Vario Monoshake, Roth, Karlsruhe
Wärmeschrank:	UM 400, Memmert, Schwabach
PCR-Platten:	ABgene PCR Plate, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PSQ-Platten:	PSQ 96 Plate Low, Quiagen, Hilden
Schüttler:	Vortex –Genie 2, VWR, Darmstadt
Magnetrührer:	IKA-COMBIMAG-RCO, IKA®-Werke, Staufen
pH-Meter:	VarioMag- Monotherm, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Kugelmühle:	MM300, Retsch, Haan
Waage:	ScoutII, OHAUS, Kirchheim
Klin.-chem. Analysegerät	Fuji DRI-CHEM 3500i, Scil, Viernheim

### 3.2.2 Chemikalien und Enzyme

Agarose, SeaKem LE	Fa. Lonza, Rockland
EDTA- Na <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Fa. Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1%	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethanol vergällt	Fa. Roth, Karlsruhe
Exonuclease I	Fa. AppliChem, Darmstadt
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Fa. Roth, Karlsruhe
NaCl	Fa. Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Fa. Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Fa. Roth, Karlsruhe
Oligonukleotide	Fa. Metabion international AG, Martinsried Fa. Sigma-Aldrich, München
Orange G	Fa. Sigma-Aldrich, München
Saccharose	Fa. Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Fa. Roth, Karlsruhe
Streptavidin Sepharose	Fa. GE HealthCare, München
Tris-HCl	Fa. Roth, Karlsruhe
Tris PUFFERAN®, Ultra Qualität	Fa. Roth, Karlsruhe
Tween20	Fa. Roth, Karlsruhe
INSTANT Virus RNA Kit	Analytik Jena AG, Jena
PyroMark Gold Q96 Reagents	Fa. Qiagen, Hilden
Qiagen Multiplex PCR-Kit	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
REPLI-g Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden
100 Basenpaar-Leiter	Fa. AppliChem, Darmstadt

### 3.2.3 Lösungen und Puffer

#### 1x- TE- Puffer

10 mM Tris

1 mM EDTA

#### 1x TAE-Puffer (pH 8,3)

40 mM Tris

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

#### Auftragspuffer (10x)

0,3% Orange G

25% Saccharose

in Aqua bidest.

#### Denaturation solution

0,2 M NaOH

#### Annealing Buffer (pH 7,6)

20mM Tris

2mM Magnesiumacetat-Tetrahydrat

pH-Wert mit 4 M Essigsäure einstellen

#### Bindungspuffer (pH 7,6)

10 mM Tris

2M NaCl

1 mM EDTA

0,1 % Tween 20

pH-Wert mit 1 M HCL einstellen

#### Waschpuffer (pH 7,6)

10 mM Tris

pH-Wert mit 4 M Essigsäure einstellen

### **3.2.4 Computerprogramme**

Clustal (Alignmentprogramm) [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2)

Oligo Primerdesign (Eurofins MWG operon, Ebersberg)

SPSS PC (Statistical Package for Social Sciences, Version 15.0)

QTL-Express, [www.gridqtl.org.uk](http://www.gridqtl.org.uk)

PSQ Assay Design Software

PyroMark™ ID Software

### **3.2.5 Internetadressen der verwendeten Datenbanken**

National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Mapviewer, [www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview)

Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org>

UniProt, [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)

Protein Data Bank, [www.rcsb.org/pdb/home/home.do](http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)

National Animal Genome Research Program, [www.animalgenome.org/pig](http://www.animalgenome.org/pig)

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Datenbankrecherche

Die Sequenzen der Kandidatengene für Erythropoetin (EPO) und für den Erythropoetin-Rezeptor (EPOR) waren bereits in der Datenbank vorhanden (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Bei beiden Einträgen handelte es sich um die genomischen Sequenzen (EPO: AJ249746, EPOR: EU407778) mit Angabe der Exon/Intron-Grenzen. Zusätzlich zu der genomischen Sequenz war für das EPO-Gen auch die Sequenz der mRNA in der Datenbank hinterlegt (NM\_214134.1).

Die Promotorsequenzen beider Gene waren in obigen Datenbankeinträgen zu Beginn der Untersuchungen nicht enthalten. Daher wurde mit Hilfe von BLAST nach übereinstimmenden Abschnitten zwischen noch nicht annotierten Sequenzen und dem 5'-Ende von EPO bzw. EPOR gesucht. Nicht annotierte Sequenzen sind Dateibankeinträge, die durch Sequenzierung der Enden von BAC-Klonen entstanden sind. Bei BAC-Klonen handelt es sich um *bacterial artificial chromosomes*, die bis zu 300 kbp große Fragmente an Fremd-DNA (hier Schweine-DNA) aufnehmen können, die anschließend in *E.coli* vermehrt werden können. Es wurden für die vorliegende Arbeit nur solche BACs ausgewählt, bei denen eine möglichst lange und lückenlose Darstellung der Sequenzen möglich war.

Für die Untersuchung des 3'-Bereiches der Gene wurde für EPO die bereits in der Datenbank vorhandene Sequenz herangezogen. Die Untersuchung des 3'-Bereiches von EPOR erfolgte wiederum mit Hilfe eines BAC.

#### 3.3.2 Primerdesign

Mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO wurden die Primer (siehe Tabelle 4) basierend auf den Gensequenzen von EPO und EPOR konstruiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer keine Schleifen (*loops*) oder Selbstkomplementaritäten aufweisen und die Annealingtemperaturen der zusammengehörigen Primer um höchstens 3°C voneinander abweichen. Die Primer mit einer Länge von 18-26 bp wurden in den Intronbereichen positioniert und es wurde darauf geachtet, dass die Amplifikate sich soweit überlappen, dass möglichst geringe Mengen an Information verloren gehen.

Der Primernamen setzt sich jeweils aus dem Kürzel des Kandidatengens und dem Exon oder Intron zusammen oder aus dem Kürzel des Kandidatengens und des Abschnittes im Promotor.

**Tabelle 4 PCR-Primer EPO-Gen**

Primer Lokalisation	Primer Name	Sequenz (5'-3')	Primer-Position	Primer-Position in genomischer DNA <sup>3</sup>	Länge (Bp)	optimierte Annealing-temperatur °C	Verwendung Q-Solution
Exon 1	EpoEx11f*	cct gag gcg ctc tgt tcc gac cc	f: 821-843 <sup>1</sup>	8014816-8014838	769	69	X
	EpoEx11r*	gga ggc cca gag gaa gca gca gca	r: 1566-1590 <sup>1</sup>	8015584-8015561			
Exon 2 +3	EpoEx23f*	cct gtc cgt cta aac caa ccc t	f: 1467-1486 <sup>1</sup>	8015462-8015483	626	61	—
	EpoEx23r*	cct cat ctt tgc tgc tcc gtt	r: 2072-2092 <sup>1</sup>	8016087-8016067			
Exon 4	EpoEx4f*	agg gtg gga agg aga atg aca gt	f: 2040-2050 <sup>1</sup>	8016035-8016057	467	61	—
	EpoEx4r*	tca cag ggg gga caa gga ga	r: 2487-2506 <sup>1</sup>	8016498-8016479			
Exon 5	EpoEx5f*	act tgt gt gcc ctt tct gga	f: 2429-2449 <sup>1</sup>	8016421-8016441	894	61	—
	EpoEx5r*	aaa aga gaa aag cca aga gcc a	r: 3301-3322 <sup>1</sup>	8017313-8017292			
Promotor	EpoIn01f*	ggg tcc tag aag ggg ggg aga ag	f: 229-260 <sup>1</sup>	8014233-8014255	715	65	X
	EpoIn01r*	tgg ggc ttg gcg ggt gc	r: 936-952 <sup>1</sup>	8014947-8014931			
Promotor	EpoProm3f*	ctt ttc aca gat gag agc act ga	f: 51268-51290 <sup>2</sup>	8013812-8013834	531	57	X
	EpoProm3r*	tca aaa tcc cag ttc ttg ttc ta	r: 51767-51798 <sup>2</sup>	8014342-8014320			
Promotor	EpoProm4f*	gaa gtt ccc agg cta ggg ttg aa	f: 51009-51031 <sup>2</sup>	8013553-8013575	359	61	X
	EpoProm4r*	tca ggt ctg ggg agc agg aat c	r: 51346-51367 <sup>2</sup>	8013911-8013890			
Promotor	EpoPromTf*	gcc taa agc ata caa aag ttt cc	f: 50850-50872 <sup>2</sup>	8013394-8013416	119	59	X
	EpoPromTr*	aaa aag tca ggg aag tct gga at	r: 50946-50968 <sup>2</sup>	8013512-8013490			
Promotor	EpoProm61f*	tga cta ttt ccc act ctt tcc	f: 50283-50303 <sup>2</sup>	8012827-8012847	528	59	—
	EpoProm61r*	aag tcc tac aaa tac agg tgg at	r: 50788-50811 <sup>2</sup>	8013354-8013332			
	EpoProm612f*	aat tat ttt att ttt agg gct gc	f: 50056-50078 <sup>2</sup>	8012600-8012622	272	57	X
	EpoProm612r*	ctc tga aga att tgg att ttg t	r: 50306-50327 <sup>2</sup>	8012871-8012850			
Promotor	EpoProm71f*	ccg agc aag tca gac cct tat ta	f: 49354-49376 <sup>2</sup>	8011899-8011921	769	57	X
	EpoProm71r*	ctc tga ttc atc ccc tag cct ag	r: 50100-50122 <sup>2</sup>	8012666-8012644			
Promotor	EpoProm8f*	cca aaa gcc cca gga gat gag c	f: 48811-48832 <sup>2</sup>	8011356-8011377	614	63	X
	EpoProm8r*	tga acg gga agg gca ggg ag	r: 49405-49424 <sup>2</sup>	8011969-8011950			
Promotor	EpoProm9f*	tga gtg gca ctt ctt gga gct gg	f: 48021-48043 <sup>2</sup>	8010566-8010588	844	61	X
	EpoProm9r*	agg tgc tgg gga ctg ctg aca g	r: 48843-48864 <sup>2</sup>	8011409-8011388			
Promotor	EpoProm10f*	agg agg agg aga ggt ctg gag	f: 47468-47488 <sup>2</sup>	8010013-8010033	654	61	X
	EpoProm10r*	ctc agc tgc cat cct tta tgt at	r: 48103-48121 <sup>2</sup>	8010666-8010644			
Promotor	EpoProm11f*	cat ccc cat gac ctt ttc tag	f: 46767- 46787 <sup>2</sup>	8009312-8009332	750	63	X
	EpoProm11r*	ctg gag ttg tgc tgg gga	r: 47489-47511 <sup>2</sup>	8010061-8017290			
3' UTR-Region	Epo3'f*	ggc aag aac tga aac cac aac	f: 3279-3299 <sup>1</sup>	8017270-8017290	585	59	—
	Epo3'r*	cag tga tga tca atg aga tgg tcc	r: 3840-3863 <sup>1</sup>	8017857-8017834			

\* f: forward Primer, r: reverse Primer

<sup>1</sup>: Position in der Erythropoetin Gensequenz (AJ249746)<sup>2</sup>: Position im BAC CH242-137H2<sup>3</sup>: Position in NC\_010445.3

X: Verwendung einer Q-Solution

**Tabelle 5 PCR-Primer EPOR-Gen**

Primer Lokalisation	Primer Name	Sequenz (5'-3')	Primer-Position	Primer-Position in genomischer DNA <sup>3</sup>	Länge (Bp)	optimierte Annelingtemperatur °C	Verwendung Q-Solution
Exon 1	EpoRex1f*	tct aga act tgg agg cgc ctg	f: 19 - 39 <sup>1</sup>	70432225-70432205	913	69	—
	EpoRex1r*	agc gtc ggt tgc gtg tct tac	r: 911 - 931 <sup>1</sup>	70431312-70431332			
Exon 2	EpoRex2f*	ggt ggg cgg gtg tgt gta gc	f: 885 - 904 <sup>1</sup>	70431358-70431339	716	69	—
	EpoRex2r*	agg gaa ggg agc aat ttg gga	r: 1580 - 1600 <sup>1</sup>	70430642-70430662			
Exon 3+4	EpoRex34f*	gac gcc ccc tgg tgg tag tgt	f: 1529 - 1549 <sup>1</sup>	70430713-70430693	779	69	—
	EpoRex34r*	cag agg gcg gac ttg ggc tat	r: 2287 - 2307 <sup>1</sup>	70429935-70429955			
Exon 5+6	EpoRex56f*	cct cag ggt ccc gtc ctt tc	f: 2245 - 1264 <sup>1</sup>	70429997-70429978	674	69	—
	EpoRex56r*	aca agt gcc tgc ccc tct ctg	r: 2898 - 2928 <sup>1</sup>	70429324-70429344			
Epo Rezeptor Exon 7+8	EpoRex78f*	ctg agg ggg tct tgg tga atg	f: 4236 - 5256 <sup>1</sup>	70428005-70427985	899	69	—
	EpoRex78r*	ctt gaa gtc atg ctg ggt ccc	r: 5114 - 4144 <sup>1</sup>	70427107-70427127			
Intron 6	EpoRIn61f*	ctc atc ctg acc ctc tcc ct	f: 2747 - 2766 <sup>1</sup>	70429495-70429476	553	57	—
	EpoRIn61r*	aag aaa aat agg aga ttg cat gg	r: 3277 - 3299 <sup>1</sup>	70428943-70428965			
Intron 6	EpoRIn62f*	ctt ggc aca tac tgt tcc ttc ta	f: 3236 - 3258 <sup>1</sup>	70429006-70428984	469	57	—
	EpoRIn62r*	tta ggg ata ctg tgt tgg gtt ct	r: 3682 - 3704 <sup>1</sup>	70428538-70428560			
Intron 6	EpoRIn6bf*	agc tgg gaa tga gtt tgg aac	f: 3605 - 3625 <sup>1</sup>	70428637-70428617	691	61	X
	EpoRIn6br*	gtg aag cca aaa gaa aag tac cta	r: 4272 - 4295 <sup>1</sup>	70427946-70427969			
Promotor	EpoRProm1f*	agt cca cat tag ctt cat cat ca	f: 36346-36368 <sup>2</sup>	70433105-70433083	501	57	—
	EpoRProm1r*	cat gaa tga gct tgt gtt tgt aa	r: 36824-36846 <sup>2</sup>	70432605-70432627			
Promotor	EpoRProm1af*	aca aac ata agc gtt aaa agt ct	f: 36750-36772 <sup>2</sup>	70432701-70432679	443	57	—
	EpoRProm1ar*	ggc tga gat aag aga gag gc	r: 37137-37197 <sup>2</sup>	70432259-70432278			
3'UTR-Region	EpoR3'3f*	cag cct tgt ccc agc ccc t	f: 42248-42266 <sup>2</sup>	70427204-70427186	817	61	X
	EpoR3'3r*	tgt caa tcg ttc tgg cgg tga t	r: 43043-43064 <sup>2</sup>	70426388-70426409			

\* f: forward Primer, r: reverse Primer      <sup>1</sup>: Position in der Erythropoetin Rezeptor Gensequenz (EU407778)

<sup>2</sup>: Position im BAC CU855518.2

<sup>3</sup>: Position in NC\_010444.3

X: Verwendung einer Q-Solution

### 3.3.3 Konzentrationsbestimmung der Primer mittels Photometrie

Alle Primer wurden als Lyophilisate geliefert und vor der weiteren Verwendung in dem im mitgelieferten Datenblatt angegebenen Volumen 1x TE aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl des aufgelösten Primers mit 395 µl 1x TE verdünnt und die Extinktion dieser Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration dieser Primerlösung wurde mit Hilfe des Lambert/Beer'schen Gesetz errechnet:

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

E = Extinktion bei 260 nm

e = Extinktionskoeffizient abhängig von der Basenzusammensetzung

c = Konzentration

d = Schichtdicke

### 3.3.4 Probenmaterial

Als Probenmaterial wurde hauptsächlich DNA verwendet, die bereits für die Arbeit von Berge (2008) isoliert worden war. Da allerdings von einigen Tieren nicht genügend extrahierte DNA zur Verfügung stand, musste zusätzlich DNA dieser Tiere aus gefrorenem Vollblut gewonnen werden. Bei Tieren, von denen kein Probenmaterial und nur noch geringe Mengen an DNA vorhanden war, wurde bereits isolierte DNA mittels *Whole Genome Amplification* vervielfältigt (siehe Kap. 3.3.4.2).

#### 3.3.4.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA wurde aus EDTA-Blut mit Hilfe des INSTANT Virus RNA Kit vorgenommen. Dazu wurden 150 µl des zu bearbeitenden Probenmaterials mit 450 µl *Lysis Solution* RL vermischt, für 10 sek geschüttelt und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

In einigen Proben hatten sich bereits Koagulate gebildet, so dass diese zuerst mit Hilfe einer Kugelmühle für 2min bei einer Frequenz von 25/s homogenisiert werden mussten und nach Zugabe der *Lysis Solution* RL für 30 – 60 min. inkubiert wurden.

Anschließend wurden zu der Probe 600 µl *Binding Solution* RBS pipettiert und vermischt. 650 µl dieser Lösung wurden nun auf einen Filter mit einer Silicagelmembran aufgetragen und für 1 min. bei 10.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der noch verbliebene Rest der Lösung hinzugefügt und wie vorher zentrifugiert.

Danach folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl Waschpuffer (*Washing Solution* HS und *Washing Solution* LS) und dazwischen jeweils eine Zentrifugation mit 10.000 x g für 1 min und nach dem zweiten Waschschrte eine weitere Zentrifugation mit 12.000 x g für 3 min.

Der Filter wurde in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und nach Zugabe von 60 µl RNase- freiem Wasser für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde noch einmal für 1 min. bei 6.000 x g zentrifugiert. Die Konzentration der so aus der Silicagelmembran gelösten DNA wurde photometrisch gemessen und die Proben bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank bei 7 °C gelagert.

#### **3.3.4.2 Whole Genome Amplification**

*Whole Genome Amplification* (WGA) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung genomischer DNA. Man unterscheidet grundsätzlich zwei verschiedene Techniken, nämlich PCR basierte und solche, die isothermisch ablaufen. Das hier verwendete REPLI-g Mini Kit der Firma Qiagen basiert auf dem isothermischen Verfahren und wird als *Multiple Displacement Amplification* (MDA) bezeichnet. Es funktioniert auch mit sehr kleinen Mengen an genomischer DNA (10 ng und weniger) und hat den Vorteil, dass es zu einer gleichmäßigen Vervielfältigung des Genoms führt, im Gegensatz zu den auf PCR basierenden Verfahren.

In der MDA wird eine hoch-prozessive  $\Phi 29$  DNA-Polymerase und Exonuklease-resistente Zufallsprimer (Hexamere) eingesetzt. Nach Denaturierung der Doppelstrang-DNA hybridisieren die Zufallsprimer an komplementäre Stellen der Einzelstrang-DNA und werden durch die DNA-Polymerase verlängert. Bei der Verlängerung trifft die DNA-Polymerase auf bereits amplifizierte DNA-Stränge, die anschließend verdrängt werden. Die verdrängten DNA-Stränge dienen dann wiederum als Einzelstrang-Vorlage für weitere Replikationen. Dadurch entstehen DNA-Abschnitte mit bis zu 100 kBp, die nach erfolgter Reaktion ohne weitere Aufreinigung direkt zur Verfügung stehen (Schock et al. 2005).

Zur Durchführung der WGA wurden 2,5 µl (mind. 10 ng) der zu vermehrenden DNA mit 2,5 µl Puffer D1 zur Denaturierung der DNA gemischt und für 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Lösung durch Zugabe von 5 µl Puffer N1

neutralisiert. Aus Wasser, Reaktionspuffer, der die Zufallsprimer enthält und der DNA-Polymerase wurde ein Mastermix hergestellt und hiervon 40 µl dazu pipettiert. Die Proben wurden für 16 Stunden bei 30°C inkubiert und danach zur Inaktivierung der DNA-Polymerase für 3 min. auf 65°C erhitzt.

Zur Kontrolle, ob die *Whole Genome Amplification* erfolgreich war, wurde eine PCR durchgeführt, bei der die vermehrte DNA unverdünnt, sowie 1:10 und 1:100 verdünnt mit RNase freiem Wasser eingesetzt wurde. Die ursprünglich aus dem EDTA-Blut isolierte DNA diente dabei als Positivkontrolle.

### **3.3.5 Amplifikation spezifischer EPO und EPO-Rezeptor-Sequenzen**

#### **3.3.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR wurde mit dem Qiagen Multiplex PCR Kit durchgeführt. Dabei wurden für einen 30 µl Ansatz jeweils 15 µl des 2x Multiplex PCR Mastermixes mit 11 µl RNase-freiem Wasser, 3 µl des Primermix (f.c. 0,4 µM) und 1 µl genomischer DNA gemischt. Die Konzentration der DNA lag zwischen 4 und 100 ng/µl.

Zur Amplifikation GC-reicher Regionen oder von DNA mit ausgeprägten Sekundärstrukturen war es nötig eine mit dem Kit mitgelieferte Q-Solution hinzuzufügen. Die eingesetzte Konzentration im PCR-Produkt betrug 0,5x.

Für jedes Primerpaar wurde die Annealingtemperatur zuerst in einer Temperaturgradienten-PCR optimiert. Die entstandenen Amplifikate wurden mittels einer Agarose-Gelelektrophorese beurteilt und mit Hilfe eines Bildanalyse-systems visuell dargestellt. Diejenigen Annealingtemperaturen, bei denen die Ausbeute an PCR-Produkt am Größten war und die keine unspezifischen Banden verursachten, wurden als optimal angesehen und für alle weiteren PCR-Reaktionen verwendet.

Mit den so optimierten Bedingungen wurden auch von den Proben aller anderen Großeltern-tiere PCRs durchgeführt, die dann nach visueller Kontrolle zur Sequenzierung vorbereitet wurden.

**Tabelle 6 Zusammensetzung eines 30 µl PCR-Reaktionsansatzes**

Reagenzien	Volumen [µl]
2x Multiplex PCR Mastermix	15,0
RNase-freies Wasser	11,0
Primermix (4 µM)	3,0
DNA (4 – 100 ng/µl)	1,0

**Tabelle 7 Zusammensetzung eines 30 µl PCR-Reaktionsansatzes mit Q-Solution**

Reagenzien	Volumen [µl]
2x Multiplex PCR Mastermix	15,0
RNase-freies Wasser	8,0
Primermix (4 µM)	3,0
5x Q-Solution	3,0
DNA (4 – 100ng/µl)	1,0

**Tabelle 8 PCR-Programm**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit	Vorgang	Zyklenzahl
1	95	15 min	Aktivierung der DNA-Polymerase	1
2	95	30 sec	Denaturierung	35
3	variabel	90 sec	Annealing	
4	72	30 sec	Extension	
5	72	10 min	Final Extension	1

### **3.3.6 Agarosegelelektrophorese**

Um die PCR-Amplifikate sichtbar machen zu können, wurden 4 µl der PCR-Produkte mit 1 µl Auftragspuffer vermischt und auf ein 1,5%iges Ethidiumbromid-haltiges (0,4-0,5 µg /ml Agarose) Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE-Puffer bei 120 V konstanter Spannung für 20 min. durchgeführt. Eine 100 Bp-Leiter diente als Größenstandard. Nach der Elektrophorese wurden die Gele digital aufgenommen und archiviert.

### **3.3.7 Vorbereitung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung**

Zur Vorbereitung für die Sequenzierung wurden zu 26 µl PCR-Produkt 1,5 µl Exonuklease I und 3 µl Alkalische Phosphatase zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 15 min. bei 37°C inkubiert und anschließend für weitere 15 min. auf 80°C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren. Danach waren die PCR-Produkte bereit für die Sequenzierung. Durch die Exonuklease I kommt es zum Abbau von überschüssigen Primern, durch die alkalische Phosphatase werden Nukleotide dephosphoryliert.

### **3.3.8 Sequenzierung der F0-Tiere**

Die PCR-Amplifikate der F0-Tiere wurden bei der Firma GATC Biotech (Konstanz) sequenziert.

### **3.3.9 Identifizierung von SNPs**

Zur Identifizierung von SNPs wurden die Sequenzen der PCR-Amplifikate der F0-Tiere miteinander verglichen. Dazu wurde zuerst ein Alignment mit Hilfe des Programms CLUSTAL X ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2)) durchgeführt und anschließend die in Frage kommenden Stellen mit dem Programm ApE direkt verglichen. Nicht übereinstimmende Basen wurden als SNPs interpretiert.

Die Stellen im Genom, an denen die Basensequenz der F0-Generation nicht eindeutig bestimmbar war oder bei denen eine Heterozygotie der Tiere zu vermuten war, wurden anhand der Gensequenzen der F1-Tiere überprüft. Die Stellen, an welchen eine korrekte Aufspaltung der 1. Filialgeneration nach Mendel zu erkennen war, wurden ebenfalls als SNPs interpretiert.

### **3.3.10 Identifikation der Genotypen in der F1-Generation**

Die Genotypen der F1-Generation wurden entweder mit Hilfe von Pyrosequenzierung ermittelt oder wie schon die Gensequenzen der F0-Tiere durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) sequenziert. Diejenigen Primer, deren Amplifikate bereits in der Sequenzierung der F0-Tiere mehrere SNPs enthielten, wurden zur Identifikation der Genotypen in der F1-Generation erneut herangezogen. Die Amplifikate, die die SNPs EP4\_1, EP4\_2, EP4\_3, EP61 EP61\_2, EP8\_1, EP8\_2, EP8\_3, EP9\_1 und EP9\_2 und EP9\_3 enthielten wurden durch die Firma GATC Biotech sequenziert. Die Genotypen der anderen detektierten SNPs wurden mittels Pyrosequenzierung identifiziert. (siehe auch Kap. 3.3.11-3.3.14)

### **3.3.11 Identifikation der Genotypen in der F2-Generation und der kommerziellen Population**

Die Genotypen der F2-Generation und der kommerziellen Population wurden mit Hilfe von Pyrosequenzierung bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, die sich vor allem zur Darstellung kurzer DNA-Sequenzen bis ca. 100 Basenpaare eignet (Durchführung siehe Kap. 3.3.13 und 3.3.14). Der Vorteil gegenüber der Methode nach Sanger besteht darin, dass gleichzeitig mehrere Genotypisierungen von verschiedenen Individuen vorgenommen werden können.

### **3.3.12 Primerdesign für die Pyrosequenzierung**

Die Primer für die Pyrosequenzierung wurden mit der PSQ Assay Design Software 1.0.6 (Biotage, Hamburg) entwickelt (Tab. 9). Nach Angabe der Position des SNPs berechnet die Software die optimalen Primer zur Amplifikation dieses DNA-Abschnittes und einen Sequenzierungsprimer, der unmittelbar vor dem SNP anheftet. Zur Immobilisierung des Sequenzierungsstranges an Streptavidin-Sepharosekügelchen wurde einer der beiden Primer mit einem Biotin am 5'-Ende synthetisiert.

**Tabelle 9 Sequenzierungsprimer für SNPs in EPO**

SNP Name	SNP Position <sup>1,2</sup>	Position in genomischer DNA <sup>3</sup>	Primername	Primersequenz (5'-3')	Primerposition <sup>3</sup>	Länge Amplifikat (Bp)	Annealing-temperatur °C	Verwendung Q-Solution
EE11	911 <sup>1</sup>	8014907	EpoEx11SNP1f	tga ggc gct ctg ttc cga	8014819-8014837	236	69	—
			EpoEx11SNP1r	caa cag ccc cag cgg taa a-Biotin	8015055-8015036			
			EpoEx11SNP1S	tgt ccc gcc agg ctt	8014892-8014907			
EE11_2	1173 <sup>1</sup>	8015168	EpoEx11SNP2f	gtg ggg cag ctt tca cct	8015117-8015135	130	59	—
			EpoEx11SNP2r	tca gct ttc tcg tca ccc aca ta-Biotin	8015247-80152424			
			EpoEx11SNP2S	agt ccc cgg gca agt	8015152-8015167			
EE2	1969 <sup>1</sup>	8015965	EpoEx2+3SNPf	aga tgg gct gtg ccg aaa g	8014996-8015013	156	59	—
			EpoEx2+3SNPr	ttc tcc ttc cca ccc tat ga-Biotin	8016052-8016032			
			EpoEx2+3SNPS	cca gac acc aag gtt aac t	8015942-8015961			
EEIn1	51812 <sup>2</sup>	8014356	EpoIn01SNP1f	tat ctg gct ttt cag ggt cct ag	8015420-8015443	265	61	X
			EpoIn01SNP1r	cat tct ggg aaa gac tgg tga c-Biotin	8014362-8014340			
			EpoIn01SNP1S	ttg agg agg cca ctg	8014463-8014478			
EEIn1_2	52059 <sup>2</sup>	8014605	EpoIn01SNP2f	tgc cca tcc agc tga gag	8014510-8014528	231	67	—
			EpoIn01SNP2r	ggg gtc ggg gct gtt atc-Biotin	8014723-8014743			
			EpoIn01SNP2S	cgc gcc cgc tgg tct	8014586-8014601			
EE1b	52278 <sup>2</sup>	8014823	EpoIn1bf	Biotin-cgc acg cac aca gct gat aa	8014708-8014728	491	65	X
			EpoIn1br	taa acc tcc acc cgg tcc	8024997-8014979-			
			EpoIn1bS	ggg gtc gga aca gag	8014841-8014826			
EP3_1	51678 <sup>2</sup>	8014224	EpoProm3SNP1f	gtt acc atc atg gct cag cag aat	8014021-8014045	264	65	—
			EpoProm3SNP1r	gcc gca cag agc aag aaa t-Biotin	8014285-8014266			
			EpoProm3SNP1S	tta gcc taa aag tcc agt at	8014203-8014223			
EP3	51487-51490 <sup>2</sup>	8014033-8014037	EpoProm3f	ttc cca gaa gcc aca aaa ttt agc	8013929-8013953	314	59	X
			EpoProm3r	cta gga ccc tga aaa gcc aga tac-Biotin	8014243-8014219			
			EpoProm3S	tgt ggg agt tac cat cat	8014014-8014032			
EP612	50253 <sup>2</sup>	8012899	EpoProm612f	taa ccc gct cag cca taa ca	8012773-8012793	293	59	X
			EpoProm612r	ggg aga ttt gat aca gga ggt aac-Biotin	8013066-8013042			
			EpoProm612S	gct cag cca taa cag g	8012770-8012895			
EP7	49593 <sup>2</sup>	801239	EpoProm71f	tcc cgg gcc ttt tct ctt tag	8012089-8012110	158	57	X
			EpoProm71r	atg ctt acc agg agt tct ttt gtg-Biotin	8012136-8012119			
			EpoProm71S	gcc att aga gat cct cc	8012119-801236			
EP9_3	48715 <sup>2</sup>	8011262	EpoProm9SNP3f	cgc cag aga aat gca aac ag	8011077-8011097	229	61	—
			EpoProm9SNP3r	aca ccc tgc acc caa tcc-Biotin	8011306-8011288			
			EpoProm9SNP3S	ccc aaa cca gcc tct	8011244-8011259			

<sup>1</sup> Position in der Erythropoetin Gensequenz (Acc. No. AJ249746)

<sup>2</sup> Position im BAC CH242-137H2 (Acc. No. FP326674.2)

<sup>3</sup> Position in in genomischer DNA (NC\_010445.3)

\* Der Sequenzierungsprimer ist bei Raumtemperatur aktiv

X Verwendung einer Q-Solution

**Tabelle 10 Sequenzierungsprimer für SNPs in EPOR**

SNP Name	SNP Position <sup>1</sup>	Position in genomischer DNA <sup>2</sup>	Primernamen	Primersequenz (5'-3')	Primerposition in genomischer DNA <sup>2</sup>	Länge Amplifikat (Bp)	Annealingtemperatur °C	Verwendung Q-Solution
ERE1	467	70431777	EpoRex1f	agc tga tat ctg agc ccc tag act	70431838-70431861	125	59	—
			EpoRex1r	ggg tcc ctg aaa aga taa aac a-Biotin	70431737-70431758			
			EpRex1S	ggg ttc tag cag aga agt	70431797-70431780			
ERE1_2	705	70431539	EpoRex1SNP2f	aca cgg ttt tca agc aga cg	70431434-70431417	166	59	—
			EpoRex1SNP2r	cgc ccc aac tca aga cat-Biotin	70431563-70431582			
			EpoRex1SNP2S	ctg ggt ccg cgg agt	70431554-70431540			
ERE 5	2373	70429870	EpoRex5+6f	tcc cac cca gac ggt cac tat	70430147-70430127	302	59	—
			EpoRex5+6r	cga acc gag ccc act ctt-Biotin	70429845-70429863			
			EpoRex5+6S	cct gct ttc att gcc	70429887-70429873			
ERE7	4953	70427289	EpoRex7+8SNP2f	tgg tgg tga ttt gga cat gg	70427514-70427495	321	59	—
			EpoRex7+8SNP2r	ggg aca agg ctg ttc tca taa gg-Biotin	70427294-70427216			
			EpoREx7+8SNP2S	cct tgt ggt gtc tga ctc	70427310-70427293			

<sup>1</sup> Position in der Gensequenz von Erythropoetin Rezeptor (Acc. No. EU407778)

<sup>2</sup> Position in genomischer DNA (NC010444.3)

\* Der Sequenzierungsprimer ist bei Raumtemperatur aktiv

X Verwendung einer Q-Solution

### 3.3.13 PCR-Amplifikation für die Pyrosequenzierung

Die Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte der F2-Tiere wurde in einem 30 µl Ansatz durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes war wie in Kap. 3.3.5.1 beschrieben. Die Annealingtemperaturen wurden zuvor mit Hilfe eines Gradientencyclers optimiert.

Anschließend wurden die Proben stichprobenweise auf ein Agarosegel aufgetragen um zu prüfen, ob die DNA-Menge für die Pyrosequenzierung ausreichend ist.

### 3.3.14 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode, die sehr häufig zur Detektion von SNPs eingesetzt, da sie sich vor allem für die Darstellung kurzer Gensequenzen eignet.

Die Methode basiert auf einem Verfahren, bei dem mit Hilfe von Chemilumineszenz der Einbau von Nukleotiden durch eine DNA-Polymerase direkt und quantitativ bestimmt werden kann. In einer zuvor genau festgelegten Reihenfolge (*dispensation order*) werden Nukleotide eingespritzt, die sich ausgehend von einem Sequenzierungsprimer an den DNA-Strang anheften können. Bei erfolgreichem Einbau eines Nukleotids wird Pyrophosphat abgespalten, das wiederum mit Hilfe der ATP-Sulfurylase in Gegenwart von Adenosin-5'-phosphosulfonat

zu Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt wird. ATP katalysiert unter Freisetzung eines Lichtblitzes die Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin durch das Enzym Luciferase. Die Menge des freigesetzten Lichtes ist hierbei proportional zu der Menge an gebildetem ATP. Dieses Lichtsignal kann nun mit Hilfe einer CCD-Kamera in ein elektrisches Signal umgewandelt werden und auf einem Computer als Peak in einem Pyrogramm graphisch dargestellt werden.

Nicht eingebaute Nukleotide werden durch das Enzym Apyrase abgebaut. Dieser gesamte Vorgang wird durch Einspritzung des nächsten Nukleotids in der *dispensation order* wiederholt.

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde für jede Reaktion 3 µl Streptavidin-Sepharose in 37 µl Bindungspuffer suspendiert und zu je 40 µl der verdünnten PCR-Produkte auf eine 96well PCR-Platte vorgelegt. Die Bindung der biotinylierten PCR-Produkte an die Streptavidin Beads erfolgte durch Inkubation für mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln. Anschließend wurden die an die Beads mit Hilfe eines *Sample Prep Tools* aufgenommen und mit 70% Ethanol gewaschen. Durch Spülen der Beads mit 0,2M NaOH wurden die PCR Produkte denaturiert und so der nicht biotinylierte DNA-Strang von den Beads abgelöst und aus der Suspension entfernt. Ein weiterer Waschschrift diente dem Entfernen bzw. der Neutralisation von Natronlaugeresten. Zum Schluss wurden die Beads in eine PSQ-Platte entlassen, die mit 0,4 µM Sequenzierungsprimer in 40 µl Annealing-Puffer gefüllt war. Die PSQ-Platte wurde zum spezifischen Annealing des Sequenzierungsprimers für 2 min. bei 80°C inkubiert und anschließend nach Abkühlung auf Raumtemperatur in den Pyrosequenzer eingesetzt.

Die Kartusche des Pyrosequenzers wurde mit Enzymmix, Substrat-Mix und Nukleotiden befüllt und in den Pyrosequenzer eingesetzt. Mit Hilfe der Pyromark ID Software (Biotage, Uppsala, Schweden) und der zu untersuchenden Sequenz wurde die *dispensation order* der Nukleotide bestimmt und die Pyrosequenzierung gestartet. Die Reaktionen konnten in Echtzeit auf dem Computer verfolgt werden. Nach erfolgter Pyrosequenzierung wurden mit Hilfe des gleichen Programmes die Genotypen der einzelnen F2-Tiere ausgewertet.

### **3.4 Phänotypen**

#### **3.4.1 Blutentnahme**

Für die Untersuchungen an F0-, F1- und F2 Tieren diente ein Tierkollektiv, das bereits in den Dissertationen von (Hepp 2006), (Berge 2008) und (Clemens 2010) verwendet wurde. Die Blutentnahme erfolgte jeweils an Tag 0, 14, 28 und 42 des Infektionsversuchs.

Für die Untersuchung einer kommerziellen Population dienten Reste von Blutproben adulter Sauen aus privaten Herdbuchzuchtbetrieben in Baden-Württemberg, die im Rahmen der Diagnostik durch den Schweinegesundheitsdienst Baden-Württemberg unabhängig von der vorliegenden Untersuchung entnommen wurden. Die Blutentnahme erfolgte aus der rechten Vena jugularis. Die Tiere wurden von einer erfahrenen Person sachgerecht mit einer Oberkieferschlinge fixiert und pro Schwein wurden 9 ml EDTA-Blut und 9 ml Vollblut in Serumröhrchen entnommen.

#### **3.4.2 Anfertigung eines Differenzialblutbildes**

Das Differentialblutbild der 59 Tiere aus dem Probeentnahmezeitraum Oktober 2009 wurde mit Hilfe des Fuji DRI-CHEM 3500i Analysegerätes in der Klinik für Schweine, Gießen erstellt. Die Parameter des roten Blutbildes umfassten die Erythrozytenzahl, den Hämatokritwert (HCT), den Hämoglobingehalt (HB) und die mittlere Hämoglobinkonzentration (MCHC).

Die Proben aus dem Jahr 2012 wurden in der Klinik für Kleintiere, Gießen untersucht. Das Differentialblutbild enthielt Werte für RBC, HB, HCT, MCV, MCH, MCHC, CHCM, RDW, HDW, PLT, WBC, MPV, Retic und CHr.

Untersuchungen ergaben keine signifikante Abweichung in der Messung der verschiedenen eingesetzten Geräte.

#### **3.4.3 Statistische Auswertung**

Die Auswertung erfolgte mit dem statistischen Programmpaket SPSS (Statistical Package for Social Sciences). Mittelwerte, Standardabweichungen und Vertrauensintervalle wurden mit „Descriptives“, Gruppenunterschiede mit einfaktorieller Varianzanalyse Anova (Oneway) berechnet.

#### 3.4.4 QTL-Analyse

Die statistischen Analysen zur Kartierung von Geneffekten erfolgte mit der online-Anwendung QTL-Express ([www.qtl.cap.ed.ac.uk/](http://www.qtl.cap.ed.ac.uk/)). Die Analyse beruht auf der Methode der kleinsten Abweichungsquadratrate für Inzucht- und Auszucht-Linien (Haley et al., 1994). Das generelle lineare Model war voreingestellt für die Merkmale Geschlecht und Untersuchungsgruppe. Das Infektionsalter war als Kovariante miteingeschlossen. Chromosomweite und genomweite Signifikanzschwellen wurden durch Permutationstests geschätzt. Auf Chromosom 2 des Schweins sind die bekannten Marker Sw2243, Sw1650, Sw240, S0091, Swr 2157, Swr345 und Swr308/148c auf den Positionen 0, 27, 62, 84, 109, 134, und 148 cM zu finden. Auf Chromosom 3 befinden sich die Marker Sw72, S0206, Swr978 Sw2570 und Sw249 an den Positionen 15, 40, 51, 70 und 110 cM. Die für die QTL-Analyse identifizierten SNPs der Gene EPO und EPOR wurden schrittweise und einzeln in die Mikrosatelliten basierte QTL-Analyse miteinbezogen, um die Einflüsse der SNPs auf die QTL zu untersuchen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 EPO

#### 4.1.1 Gensequenz EPO

Die Gensequenz für das Erythropoetin-Gen war bereits in der Gendatenbank abgelegt und konnte direkt daraus entnommen werden (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); Acc.No. AJ249746). Auch die Exon-Intron-Grenzen des Gens waren bereits bekannt. Die Promotorsequenz konnte mit Hilfe eines passenden Bacterial Artificial Chromosom (BAC) identifiziert werden. Die größte Übereinstimmung zeigte hierbei BAC CH242-137H (Acc.No. FP326674.2). Ein Teil der 3'UTR-Region war über eine Länge von insgesamt 577 bp in der Sequenz des EPO-Gens enthalten und wurde ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen.

(Darstellung der Sequenzen siehe Anhang)

**Tabelle 11 Exon-Intron-Grenzen von EPO**

Exon	Lokalisation <sup>1</sup>
1	983-995
2	1536-1678
3	1902-1988
4	2228-2407
5	2577-3296

<sup>1</sup>Lokalisation in der Gensequenz mit der Acc. No. AJ249746)

#### 4.1.2 Alignment der Sequenzen von EPO

Zur Detektion von SNPs wurde mit Hilfe des Programmes CLUSTAL X ein Alignment der Sequenzen des EPO-Gens sowie des Promotorbereichs von Meishan-Sauen und Pietrain-Ebern durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass jeweils mindestens zwei Sauen und zwei Eber in die Untersuchungen einbezogen wurden. Im Vergleich nicht übereinstimmende Basen wurden als SNPs identifiziert. N steht dabei für das Auftreten von zwei verschiedenen Allelen bei einem Tier.

Zur Veranschaulichung sind immer jeweils eine Sau und ein Eber dargestellt, bzw. drei Elterntiere, wenn sowohl homozygote als auch heterozygote Tiere eines Geschlechts auftraten. Aus Platzgründen werden nur diejenigen Teilabschnitte gezeigt, in welchen SNPs

vorgefunden wurden. Die Zahlen in Schema 1 geben die Lokalisation in der Sequenz AJ249746 an; die Zahlen in Schema 2 bestimmen die Position in Relation zum Transkriptionsstartpunkt.

**Schema 1 Alignment der Sequenzen der F0-Tiere von EPO**

EpoEx11f

```
M689      AGGTGGCCCTGTCCCGCCAGGCTTCCCAGGATGCGGGCTCCCGGCGCCGGCACC
Mumm      AGGTGGCCCTGTCCCGCCAGGCTTTCCAGGATGCGGGCTCCCGGCGCCGGCACC
Mustang   AGGTGGCCCTGTCCCGCCAGGCTTNCCAGGATGCGGGCTCCCGGCGCCGGCACC
          *****
          ...888.....EE11.....940
```

EpoEx11f

```
M689      GGAGTCCCCGGGCAAGTCGGAACCTGAGCTGGGACCGGGTGGAGGTTTACAGGT
Mumm      GGAGTCCCCGGGCAAGTCGAAACCTGAGCTGGGACCGGGTGGAGGTTTACAGGT
          *****
          ...1254.....EE11_2.....1207
```

EpoEx23f

```
M687      GTCCCAGACACCAAGGTTAACTTCTNTGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGAGTTCC
Mumm      GTCCCAGACACCAAGGTTAACTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTGAGTTCC
          *****
          ...1944.....EE2.....1997
```

**Schema 2 Alignment der F0-Tiere des EpoPromotors**

EpoIn01f

```

M689   CTGGGATTTTGAGGAGGCCACTGGCGTGCCCCACCAGCACCTTTTCGGCTTCCA
Mumm   CTGGGATTTTGAGGAGGCCACTGGTGTGCCCCACCAGCACCTTTTCGGCTTCCA
Mustang CTGGGATTTTGAGGAGGCCACTGGNGTGCCCCACCAGCACCTTTTCGGCTTCCA
*****
-647.....EEIn1.....-594
    
```

EpoIn01f

```

M689   CGTGCCCCGCACCCGCGCCCGCTGGTCTCACGCCCTGAGGGCCCCCGACCCAG
Mumm   CGTGCCCCGCACCCGCGCCCGCTGGTCTCACGCCCTGAGGGCCCCCGACCCAG
Mustang CGTGCCCCGCACCCGCGCCCGCTGGTCTCACNCCCCTGAGGGCCCCCGACCCAG
*****
-406.....EEIn1_2.....-353
    
```

EpoIn01f

```

M689   CGTCCTCCGGACCCTGGCTGGGGGCCCTGAG-CGCTCTGTTCCGACCCCGCCTC
Mumm   CGTCCTCCGGACCCTGGCTGGGGGCCCTGAGGCGCTCTGTTCCGACCCCGCCTC
*****
-187.....EE1b.....-134
    
```

EpoProm3f

```

M684   TAAAGAATTTTGTGGGAGTTACCATCAT----CAGCAGAATCGAGTCTGACTAG
Mumm   TAAAGAATTTTGTGGGAGTTACCATCATGGCTCAGCAGAATCGAGTCTGACTAG
Mustang TAAAGAATTTTGTGGGAGTTACCATCATNNNNGGGCAAATCAAGCCTGACTGA
*****
-975.....EP3.....-932
    
```

EpoProm3f

M684 TTCAGTAT**T**TGGCTTTTCAGGGTCCTA-GAAGGGGGGGAAAAAACCCCCNAAT  
 Mumm TTCAGTAT**C**TGGCTTTTCAGGGTCCTA-GAAGGGGGGGAGAAGACCCCCCAAAT  
 \*\*\*\*\*  
 -764.....**EP3\_1**.....-711

EpoProm4f

M689 ACCCACTGAAAGGGGCCAGGGATTGAAC**C**TTGTCCTCACAGATACTAGTTGAG  
 Mumm ACCCACTGAAAGGGGCCAGGGATTGAAC**T**TTGTCCTCACAGATACTAGTTGAG  
 Mustang ACCCACTGAAAGGGGCCAGGGATTGAAC**N**TTGTCCTCACAGATACTAGTTGAG  
 \*\*\*\*\*  
 -1302.....**EP4\_1**.....-1249

EpoProm4f

M689 TACTCCTGAGCCACAGTGCAGACTTCTC**A**TCTTTTATGAGAACTGCATGAGCT  
 Mumm TACTCCTGAGCCACAGTGCAGACTTCTC**G**TCTTTTATGAGAACTGCATGAGCT  
 Mustang TACTCCTGAGCCACAGTGCAGACTTCTC**N**TCTTTTATGAGAACTGCATGAGCT  
 \*\*\*\*\*  
 -1243.....**EP4\_2**.....-1190

EpoProm4f

M689 GGACTGGTGTTCATGACAC**C**ATTTTCACAGATGAGA-GCACTGAGGTTTCAGG  
 Mumm GGACTGGTGTTCATGACAC**T**TTTCACAGATGAGA-GCACTGAGGTTTCAGG  
 Mustang GGACTGGTGTTCATGACAC**N**TTTCACAGATGAGA-GCACTGAGGTTTCAGG  
 \*\*\*\*\*  
 -1116.....**EP4\_3**.....-1063

EpoProm61f

M690 CCCCATCTCCACCTCTC**T**TCCCACAGCCTCCACCCCAACTAGGCAATGGACCAA  
Mumm CCCCATCTCCACCTCTC**C**TCCCACAGCCTCCACCCCAACTAGGCAATGGACCAA  
Mustang CCCCATCTCCACCTCTC**N**TCCCACAGCCTCCACCCCAACTAGGCAATGGACCAA  
\*\*\*\*\*  
-2056.....**EP61\_1**.....-2003

EpoProm61f

M690 AAATCTCCCTTGATTCCCTCTGCTGGAG**G**GTGAGCTCCCCTCTTCCAAACTCTTA  
Mumm AAATCTCCCTTGATTCCCTCTGCTGGAA**A**GTGAGCTCCCCTCTTCCAAACTCTTA  
Mustang AAATCTCCCTTGATTCCCTCTGCTGGAN**N**GTGAGCTCCCCTCTTCCAAACTCTTA  
\*\*\*\*\*  
-1867.....**EP61\_2**.....-1868

EpoProm612f

M689 ACCCGCTCAGCCATAACAGGAAC**N**CCCACATGTATATTTCTTGAGTGAGTGAGT  
Mumm ACCCGCTCAGCCATAACAGGAAC**G**CCCACATGTATATTTCTTGAGTGAGTGAGT  
\*\*\*\*\*  
-2203.....**EP612**.....-2150

EpoProm71f

M684 CCTCCAT**N**TTTTATTCATTTTTGTGTTTATCATCCATCTCTCCACTAGAATGTC  
M689 CCTCCAT**C**TTTTATTCATTTTTGTGTTTATCATCCATCTCTCCACTAGAATGTC  
Mustang CCTCCAT**A**TTTTATTCATTTTTGTGTTTATCATCCATCTCTCCACTAGAATGTC  
\*\*\*\*\*  
-2820.....**EP7**.....-2767

EpoProm8f

M687 CTCTCCCTCTCCGCTGGCTGCGTCTACCTCCCCATCTGTCCCTGGCCCCCTCT  
 Mumm CTCTCCCTCTCCTCTGGCTGCGTCTACCTCCCCATCTGTTCCTGGCCCCCTCT  
 Mustang CTCTCCCTCTCCNCTGGCTGCGTCTACCTCCCCATCTGTNCCTGGCCCCCTCT  
 \*\*\*\*\*  
 -3453.....EP8\_1.....EP8\_2.....-3400

EpoProm8f

M687 AGCCAGTACACCACGTTCAAGGGGGGCCCCAGAGCAGGCTCAAGGTGAGCAGA  
 Mumm AGCCAGTACACCACGTTCAAGGGGGGCCCCAGAGCAGGATCAAGGTGAGCAGA  
 Mustang AGCCAGTACACCACGTTCAAGGGGGGCCCCAGAGCAGGNTCAAGGTGAGCAGA  
 \*\*\*\*\*  
 -3150.....EP8\_3.....-3097

EpoProm9f

M687 ACCATCCAATAAGTCCATGTGAAGGGGGAGTGGGAACGAGCCAAGTGGGAGAA  
 Mumm ACCATCCAATAAGTCCATGTGAAGGGGGAGTGGGAACGAGCCAAGTGGGAGAA  
 Mustang ACCATCCAATAAGTCCATGTGAAGGGGGAGTGGGAACGAGCCAAGTGGGAGAA  
 \*\*\*\*\*  
 -4163.....EP9\_1.....-4110

EpoProm9f

M687 GGCTGTAGAGGCAGGTGGATGGCAGCGCACAAAGGGTCTTCGTTTCAGAGGCGAC  
 Mumm GGCTGTAGAGGCAGGTGGATGGCAGCACACAAAGGGTCTTCGTTTCAGAGGCGAC  
 Mustang GGCTGTAGAGGCAGGTGGATGGCAGCGCACAAAGGGTCTTCGTTTCAGAGGCGAC  
 \*\*\*\*\*  
 -4107.....EP9\_2.....-4054

EpoProm9f

```
M687      AGCACCTGTGCTGAAGCTGGCCCCCAAACCAGCCTCTGCGCCCTGAGTGGAGTT
Mumm      AGCACCTGTGCTGAAGCTGGCCCCCAAACCAGCCTCTGCACCCTGAGTGGAGTT
Mustang   AGCACCTGTGCTGAAGCTGGCCCCCAAACCAGCCTCTGCNCCCTGAGTGGAGTT
*****
-3757.....EP9_3.....-3704
```

4.1.3 Genotypen

Tabelle 12 Genotypen der F0-Generation bei SNPs von EPO

	M 684	M 687	M 689	M 690	Mm	Mg	V
EE11		C/C	C/C	C/C	T/T	T/C	T/C
EE11_2	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A
EE2	T/A	T/A	T/A	T/A	A/A	A/A	A/A
EEIn1	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/T	C/T
EEIn1_2	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	T/G	T/G
EE1b		dd	dd	dd	DD	DD	DD
EP3	dd	dd			DD	Dd	Dd
EP3_1	T/T	T/T			C/C		
EP4_1	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/C	T/C
EP4_2	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/A	G/A
EP4_3	A/A	A/A	A/A	A/A	T/T	T/A	T/A
EP61_1	C/T	C/T	C/T	C/T	C/C	C/C	C/C
EP61_2	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	A/G	A/G
EP612	T/G	T/G	T/G	T/G	G/G	G/G	G/G
EP7	C/A		C/C			A/A	A/A
EP8_1	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/T	G/T
EP8_2	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/T	C/T
EP8_3	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	C/A	C/A
EP9_1	A/A	A/A	A/A	A/A	G/G	G/A	G/A
EP9_2	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/A	G/A
EP9_3	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/A	

Mm = Eber Mumm, Mg = Eber Mustang, V = Eber Vermont

A=Adenin, G=Guanin, T=Thymin, C=Cytosin, D=Allel für Deletion, d=Allel ohne Deletion

Aufgrund der hohen Variabilität im EPO-Gen bei häufig auftretender Heterozygotie der Elterntiere wurde, um eine besser Aussage über die Informativität der SNPs treffen zu können, eine Analyse der Genotypen der F1-Generation hinzugezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Da Deletionen, auch wenn sie im Intron- oder Promotorbereich eines Gens liegen, zu einer veränderten Genaktivität führen können, wurden die SNPs EE1b und EP3 direkt ohne vorherige Bestimmung der Genotypen der F1-Generation für eine weitere Analyse ausgewählt.

**Tabelle 13 Genotypen der F1-Generation**

Tier	EE11	EE11_2	EE2	EEIn1	EEIn1_2	EP4_1	EP4_2	EP4_3	EP61
51	C/T	A/G	A/T	C/T		T/C	G/A	T/A	C/C
54	C/T	A/G	A/A	C/C	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C
55	C/T	A/G	A/T	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	C/C
56	C/T	A/G	A/A	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	C/C
57	C/T	A/G	A/T	C/T		T/C	G/A	T/A	T/C
2		A/G	A/T	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	C/C
3	C/T	A/G	A/T	C/C	G/G	C/C	A/A	A/A	C/C
5	C/T	A/G	A/T	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	T/C
9	C/T	A/G	A/T	C/C	G/G	C/C	A/A	A/A	T/C
11	C/T	A/G	A/A	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	C/C
12	C/T	A/G	A/T	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	T/C
14	C/T	A/G	A/A	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	C/C
18	C/T	A/G	A/T	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	C/C
19	C/T	A/G	A/T	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	C/C
21		A/G	A/A						
23	C/T	A/G	A/A	C/C		C/C	A/A	A/A	C/C
24	C/T	A/G	A/A	C/T	T/G	T/C	G/A	T/A	C/C

Tier	EP61_2	EP612	EP7	EP8_1	EP8_2	EP8_3	EP9_1	EP9_2	EP9_3
51	A/G	G/G	C/C	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
54	G/G	G/G	A/A	G/G	C/C	C/C	A/A	G/G	G/G
55	A/G	G/G	C/C	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
56	A/G	G/G	C/A	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
57	A/G	T/G	C/C	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
2	A/G	G/G	C/C	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
3	G/G	G/G	C/A	G/G	C/C	C/C	A/A	G/G	G/G
5	A/G	T/G	C/C	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
9	G/G	T/G	C/A	G/G	C/C	C/C	A/A	G/G	G/G
11	A/G	G/G	C/A	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
12	A/G	T/G	C/C	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
14	A/G	G/G	C/A	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
18	A/G	G/G	C/C	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
19	A/G	G/G	C/C	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G
21			C/C	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	G/G
23	G/G	G/G	A/A	G/G	C/C	C/C	A/A	G/G	G/G
24	A/G	G/G	C/A	T/G	T/C	A/C	A/G	A/G	A/G

A=Adenin, G=Guanin, C= Cytosin, T=Thymin

#### 4.1.4 Darstellung der SNPs in EPO

Insgesamt konnten beim Vergleich von Meishan und Pietrain für das EPO-Gen 21 SNPs im Genom gefunden werden. Davon liegt ein SNP im codierenden Bereich in Exon 3, ein SNP im Intron 1 und ein SNP in der 5'UTR. 18 SNPs sind im Promotorbereich des Gens lokalisiert.

Der SNP in Exon 3 (EE2) liegt im Basentriplet an Position 2 und hat eine Änderung der Aminosäuresequenz des translatierten Proteins zur Folge. Pietrain tragen ausnahmslos die Base Adenin und haben in ihrer Proteinsequenz die Aminosäure Tyrosin. Bei Meishan kommen die Basen Thymin und Adenin vor. Die Tiere dieser Rasse können in ihrer Proteinsequenz die Aminosäuren Tyrosin oder Phenylalanin tragen.

Bei den SNPs im Promotor- und Intronbereich und in der 5'UTR ist es ebenfalls so, dass jeweils eine Rasse an der Position des SNPs homozygot für eine Base ist. Die andere Rasse weist sowohl Individuen auf, die homozygot für eine andere Base sind, als auch Individuen, die heterozygot sind, also beide Basenvarianten in ihrem Genom tragen. Dabei entfallen die Heterozygoten je nach SNP auf Meishan oder Pietrain. Die genauen Genotypen der Elterntiere sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 14 Basenaustausch**

SNP Name	offizielle Nomenklatur	Basenaustausch	
		Meishan	Pietrain
EE11	c.-72T>C	C	T, (C)
EE11_2	c.12+179A>G	G	A
EE2	c.987A>T	T, (A)	A
EEIn1	c.-623T>C	C	T, (C)
EEIn1_2	c.-375T>G	G	T, (G)
EE1b	c.-156delG	-	G
EP3	c.-947_943delGATC	-	GATC
EP3_1	c.-756C>T	T	C
EP4_1	c.-1273T>C	C	T, (C)
EP4_2	c.-1214G>A	A	G, (A)
EP4_3	c.-1093T>A	A	T, (A)
EP61_1	c.-2039C>T	T, (C)	C
EP61_2	c.-1894A>G	A	G, (A)
EP612	c.-2180G>T	T, (G)	G
EP7	c.-2813C>A	C, (A)	A
EP8_1	c.-3440T>G	G	T, (G)
EP8_2	c.-3413T>C	C	T, (C)
EP8_3	c.-3111A>C	C	A, (C)
EP9_1	c.-4140G>A	A	G, (A)
EP9_2	c.-4081A>G	G	A, (G)
EP9_3	c.-3718A>G	G	A, (G)

A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin, T=Thymin, c. Position in codierender DNA

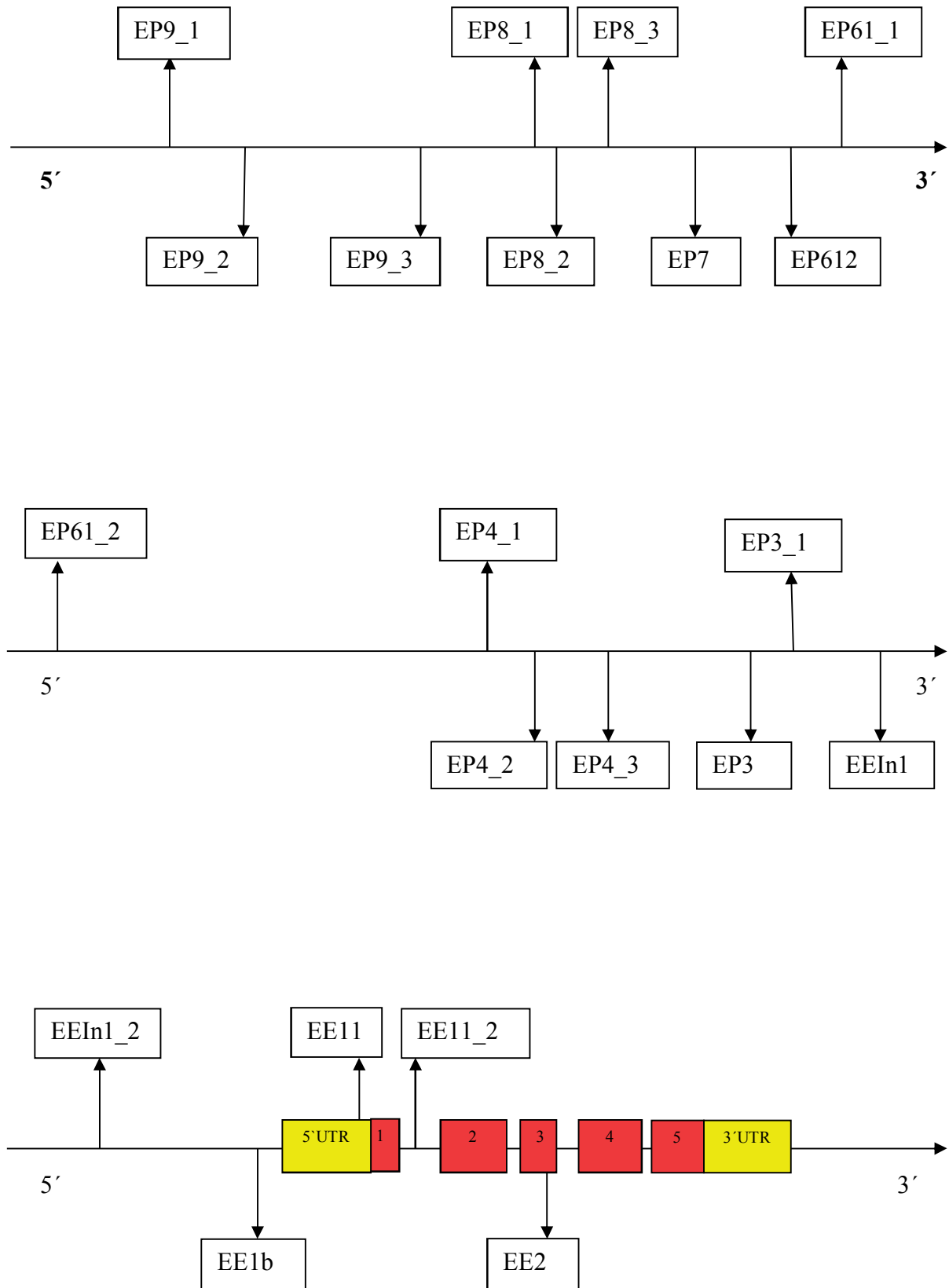


Abb. 10 Schematische Darstellung der SNPs in EPO

#### 4.1.5 Aminosäuresequenz von EPO

Die Aminosäuresequenz von Erythropoetin weist bei Pietrain an Position 75 Tyrosin auf. Bei Meishan kann sich an dieser Position ebenfalls die Aminosäure Tyrosin befinden aber auch die Aminosäure Phenylalanin. Die Sequenz ist vergleichend für beide Schweinerassen in Schema 3 dargestellt. Die Mutation bewirkt jedoch keine Änderung der Sekundärstruktur des Proteins.

#### Schema 3 Aminosäuresequenz von EPO

Pietrain MGARECPARLLLLLSSLLLLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYILEAKEGENA

Meishan MGARECPARLLLLLSSLLLLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYILEAKEGENA

Pietrain TMGCAESCSFSENITVDPDKVNFY AWKRMEVQQQAMEVWQGLLALLSEAI

Meishan TMGCAESCSFSENITVDPDKVNFY/FAWKRMEVQQQAMEVWQGLLALLSEAI

Pietrain LQGQALLANSSQPSEALQLHVDKAVSGLRSLTSLLRALGAQKEAIPLPDAS

Meishan LQGQALLANSSQPSEALQLHVDKAVSGLRSLTSLLRALGAQKEAIPLPDAS

Pietrain PSSATPLRTFAVDTLCKLFRNYSNFLRGKLTLYTGEACRRRDR

Meishan PSSATPLRTFAVDTLCKLFRNYSNFLRGKLTLYTGEACRRRDR

Buchstabencode für Aminosäuren:

Alanin = A, Arginin = R, Asparagin = N, Asparaginsäure = D, Cystein = C, Glutamin = Q, Glutaminsäure = E, Glycin = G, Histidin = H, Isoleucin = I, Leucin = L, Lysin = K, Methionin = M, Phenylalanin = F, Prolin = P, Serin = S, Threonin = T, Tryptophan = W, Tyrosin = Y, Valin = V

## 4.2 EPOR

### 4.2.1 Gensequenz EPOR

Die Gensequenz für das Erythropoetin-Rezeptor-Gen war ebenfalls in der Gendatenbank abgelegt und konnte direkt daraus entnommen werden (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), Acc.No. EU407778). Auch die Exon-Intron-Grenzen dieses Gens waren bekannt. Die Promotorsequenz konnte anhand eines BAC CH242-272A5 (Acc.No. 855518.2) zur Untersuchung herangezogen werden. Ein zweiter BAC, der die 3'UTR-Region des Erythropoetin-Rezeptors enthält, konnte ebenfalls identifiziert werden. Hier erwies sich auch der BAC CH242-272A5 als am geeignetsten.

(Darstellung der Sequenzen siehe Anhang)

**Tabelle 15** Exon-Intron-Grenzen von EpoRezeptor-Gen

Exon	Lokalisation <sup>1</sup>
1	160-274
2	1112-1247
3	1622-1800
4	1876-2033
5	2503-2656
6	2736-2823
7	4299-4386
8	4480->5091

<sup>1</sup> Lokalisation in der Gensequenz mit der Acc. No.EU407778

### 4.2.2 Alignment der Sequenzen von EPOR

Im Bereich der EPOR-Gensequenz konnten vier SNPs detektiert werden. Davon liegt ein SNP im Bereich codierender DNA in Exon 8. Zwei SNPs liegen in Intron 1 und ein SNP liegt in Intron 4. Im Promotorbereich wurde auf einer Länge von insgesamt 1468 bp kein SNP gefunden. Zur Veranschaulichung sind auch hier die Alignments der Sequenzen von je zwei Sauen und einem Eber dargestellt. Die Zahlen in Schema 4 geben die Positionen in der Sequenz EU407778 an (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). N steht auch hier für das Vorkommen eines heterozygoten Genotyps.

**Schema 4 Alignment der F0-Tiere von EPOR**

EpoREx1f

M684 TATCCCCAGGCTGGGTCTAGCAGAGAAGTTANAGAGGGGCATTAGAGTCCT  
 M687 TATCCCCAGGCTGGGTCTAGCAGAGAAGTTACAGAGGGGCATTAGAGTCCT  
 Mustang TATCCCCAGGCTGGGTCTAGCAGAGAAGTTACAGAGGGGCATTAGAGTCCT  
 \*\*\*\*\*  
 435.....ERE1.....486

EpoREx1f

M684 GCAGACGCCAGATCCCTGGGTCCGCGGAGTNGAGGGAGGGGGGCAAGGGGCA  
 M687 GCAGACGCCAGATCCCTGGGTCCGCGGAGTTGAGGGAGGGGGGCAAGGGGCA  
 Mustang GCAGACGCCAGATCCCTGGGTCCGCGGAGTTGAGGGAGGGGGGCAAGGGGCA  
 \*\*\*\*\*  
 675.....ERE1\_2.....720

EpoREx56f

M687 CAGGCCCCGCCTCCTGCTTTTCATTGCCTANCTCCCCAAGAGTGGGCTCGGTT  
 M689 CAGGCCCCGCCTCCTGCTTTTCATTGCCTACTCTCCCCAAGAGTGGGCTCGGTT  
 Mustang CAGGCCCCGCCTCCTGCTTTTCATTGCCTATCTCCCCAAGAGTGGGCTCGGTT  
 \*\*\*\*\*  
 2344.....ERE5.....2395

EpoREx78f

M687 AAGTACTTGTACCTTGTGGTGTCTGACTCTGGNATCTCAACTGACTACAGCT  
 M689 AAGTACTTGTACCTTGTGGTGTCTGACTCTGGCATCTCAACTGACTACAGCT  
 Mustang AAGTACTTGTACCTTGTGGTGTCTGACTCTGGTATCTCAACTGACTACAGCT  
 \*\*\*\*\*  
 4921.....ERE7.....4972

### 4.2.3 Darstellung der SNPs in EPOR

Insgesamt konnten in EPOR vier SNPs gefunden werden. Zwei SNPs liegen in Intron 1 (ERE1, ERE1\_2). Der vorherrschende Genotyp ist bei SNP 1 in Intron 1 C/C und bei SNP 2 T/T. Allerdings können Meishan an den jeweiligen Positionen auch den Genotyp C/T bei SNP 1 und G/T bei SNP 2 tragen.

Beim SNP in Intron 4 (ERE5) befindet sich bei Pietrain an dieser Stelle die Base Thymin. Bei Meishan kommen sowohl homozygote Tiere mit der Base Cytosin als auch Tiere, deren Gensequenz Cytosin und Thymin beinhaltet, vor.

Ein SNP befindet sich in Exon 8 (ERE7). Hier tragen die Pietrain-Eber ebenfalls nur die Base Thymin. Meishan dagegen können wieder sowohl nur Cytosin oder Cytosin und Thymin tragen.

Aufgrund ihrer Lage im Intron haben die SNPs ERE1, ERE1\_2 und ERE5 keinen Effekt auf die Primärstruktur des Proteins. ERE7 dagegen liegt in einem Exon und wird translatiert. Der SNP ist an dritter Stelle im Basentriplett positioniert. Es können die Varianten „GGC“ und „GGT“ entstehen. Allerdings codieren beide Triplets für die Aminosäure Glycin, so dass es auch hier zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz des Proteins kommt.

**Tabelle 16 Basenaustausch**

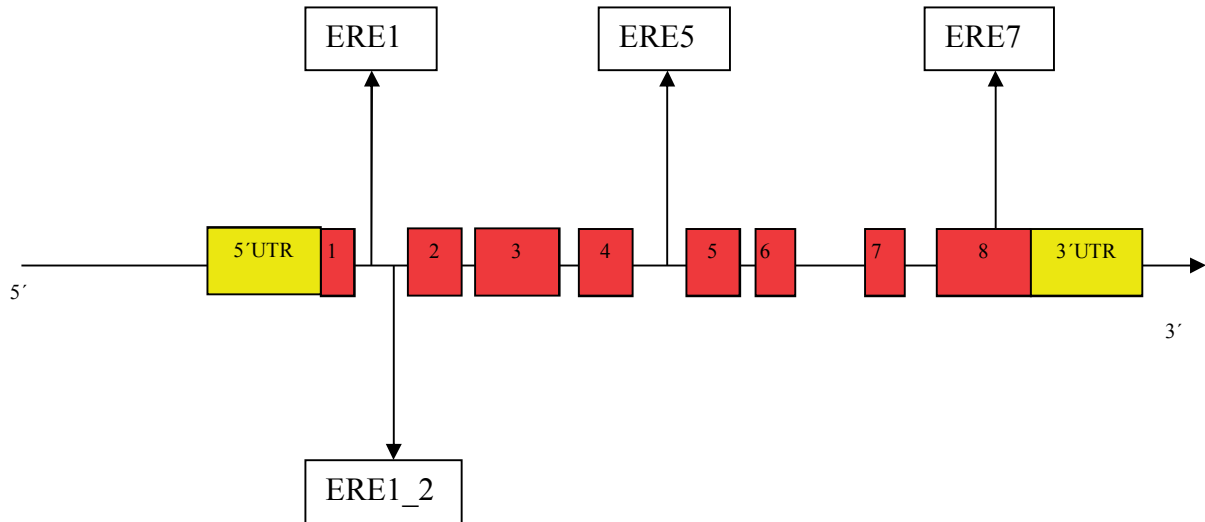
SNP Name	Offizielle Nomenklatur	Genotyp Meishan	Genotyp Pietrain
ERE1	c.274+193C>T	C, (T)	C
ERE1_2	c.274+431T>G	T, (G)	T
ERE5	c.588-130C>T	C, (T)	T
ERE7	c.1551C>T	C, (T)	T

c. Position in codierender DNA, C = Cytosin, T = Thymin, G = Guanin

**Tabelle 17 Genotypen der F0-Generation bei SNPs von EPOR**

	M 684	M 687	M 689	M 690	Mm	Mg	V
ERE1	C/T	C/C				C/C	C/C
ERE1_2	G/T	T/T				T/T	T/T
ERE5	C/T	C/T	C/C	C/C	T/T	T/T	T/T
ERE7		C/T	C/C	C/C	T/T	T/T	

Mm = Eber Mumm, Mg = Eber Mustang, V = Eber Vermont, C = Cytosin, T = Thymin, G = Guanin



**Abb. 11 Graphische Darstellung der SNPs in EPOR**

**Schema 5 Aminosäuresequenz von EPOR**

MYHFGATLWP GVGSLCLLLA GATWAPSPNS PDAKFESKAA LLAARGPEEL  
 LCFTERLEDL VCFWEEAGSA GVGPEYDYSFS YQLEGE PWKP CHLHQGPTAR  
 GSVRFWCSLP TADTSSFVPL ELRVTEVSSG APRYHRIIHI NEVVLLDPPA  
 GLLARRAEES GHVVLRLWLP PGAPMASLIR YEVNISTENA AGGVQRVEIL  
 DGRTECVLSN LRGGTRYTFM VRARMAEPSF GGFWSAWSEP ASLLTASDL  
 PLILTLSLIL VLILLLLAVL ALLSHRRTLK QKIWP GIPSP EGEFEGFLT  
 HKGNFQLWLY QTDGCLWWS P CTPFAEDPPA PLEVLSERCW GVTQAVEPAA  
 DDEGSLLEPV GSEHARDTYL VLDKWLLPRR PASEDL PQPG GDLDMAAMDE  
 ASEASFCSSA LALKPGPEGA SAASFEY TIL DPSSQLLRPR ALPAELPPTP  
 PHLKYLYLVV SDSGISTDYS SGGSQETQGG SSSGPYSNPY ENSLVPAP  
 EPPNYVTCS

Buchstabencode für Aminosäuren:

Alanin = A, Arginin = R, Asparagin = N, Asparaginsäure = D, Cystein = C, Glutamin = Q, Glutaminsäure = E,  
 Glycin = G, Histidin = H, Isoleucin = I, Leucin = L, Lysin = K, Methionin = M, Phenylalanin = F, Prolin = P,  
 Serin = S, Threonin = T, Tryptophan = W, Tyrosin = Y, Valin = V

### 4.3 Auswahl der SNPs für weitere Untersuchungen

Aufgrund der großen Anzahl an gefundenen SNPs im EPO-Gen wurden für weitere Untersuchungen nur bestimmte SNPs ausgewählt. Kriterien für die Auswahl waren sowohl die Lage der SNPs im Genom als auch die Genotypen der Parenteralgeneration. SNPs in der codierenden Sequenz wurden mit einbezogen, weil hier die Möglichkeit besteht, aufgrund der veränderten Aminosäuresequenz die Struktur des Proteins zu beeinflussen (EE2). Des Weiteren wurden alle SNPs herangezogen, an deren Position alle Elterntiere homozygot sind (EE1b, EP3, EP3\_1). Außerdem wurde ein SNP in der 5'UTR des EPO-Gens (EE11) und ein SNP in Intron 1 (EE11\_2) verwendet. Im Promotor liegende SNPs sind EE1b, EP3, EP3\_1 und EP9\_3, der als ein möglichst weit vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegender SNP ebenfalls untersucht wurde. Insgesamt handelt es sich um sieben SNPs aus dem EPO-Gen.

Die im EPOR-Gen gefundenen vier SNPs wurden alle in die Berechnungen einbezogen, so dass für weitere Untersuchungen insgesamt elf SNPs zur Verfügung standen.

### 4.4 Genotypen und Allelfrequenzen in der F2-Generation

In der F2-Generation waren bei acht der untersuchten SNPs jeweils alle möglichen drei Genotypvarianten existent. Bei EP3\_1 traten allerdings nur die beiden Genotypen T/T und C/T auf. Das bei den Pietrain vorherrschende Allel C fehlte. Bei ERE1 und ERE1\_2 kam es ebenfalls zu einer Ungleichverteilung der Genotypvarianten, was allerdings bereits durch die Genotypen in der Parenteralgeneration zu erwarten war. Bei ERE 1 fehlte der Genotyp T/T in der F2-Generation. Hier waren nur die beiden Varianten C/C und C/T existent. Bei ERE1\_2 konnte kein Tier mit dem Genotyp G/G identifiziert werden. Es kamen nur die beiden Varianten T/T und T/G vor.

Die Häufigkeiten aller Genvarianten in der F2-Generation und die Allelfrequenzen der einzelnen SNPs sind in Tabelle 18 dargestellt. Zur Vereinfachung werden sowohl in Tabelle 18 als im Nachfolgenden, die bei den jeweiligen Rassen vorherrschende Allele, als Pietrain- bzw. Meishan-Allele bezeichnet.

**Tabelle 18 Genotypen und Allelfrequenzen der F2-Generation**

SNP	Genotypen			ME-Allele	PI-Allele
EE11	CC	CT	TT	C	T
	29,4	50,4	20,2	54,6	45,4
EE11_2	GG	GA	AA	G	A
	38,7	49,6	11,8	63,4	36,6
EE2	TT	TA	AA	T	A
	6,7	35,3	58,0	24,4	75,6
EE1b	dd	Dd	DD	D	d
	14,3	39,0	46,8	66,2	33,8
EP3_1	CC	CT	TT	T	C
	0,0	90,0	10,0	55,0	45,0
EP3	DD	Dd	dd	D	d
	43,2	45,5	11,4	65,9	34,1
EP9_3	GG	GA	AA	G	A
	42,9	44,5	12,6	65,1	34,9
ERE1	CC	CT	TT	T	C
	94,0	6,0	0,0	3,0	97,0
ERE1_2	TT	TG	GG	G	T
	91,8	8,2	0,0	4,1	95,9
ERE5	CC	CT	TT	C	T
	19,6	44,8	36,1	41,8	58,2
ERE7	CC	CT	TT	C	T
	19,3	46,2	34,5	42,4	57,6

ME = Meishan, PI = Pietrain

A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin, D = Allel für Deletion, d = Allel ohne Deletion

#### 4.5 Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp in der F2-Generation

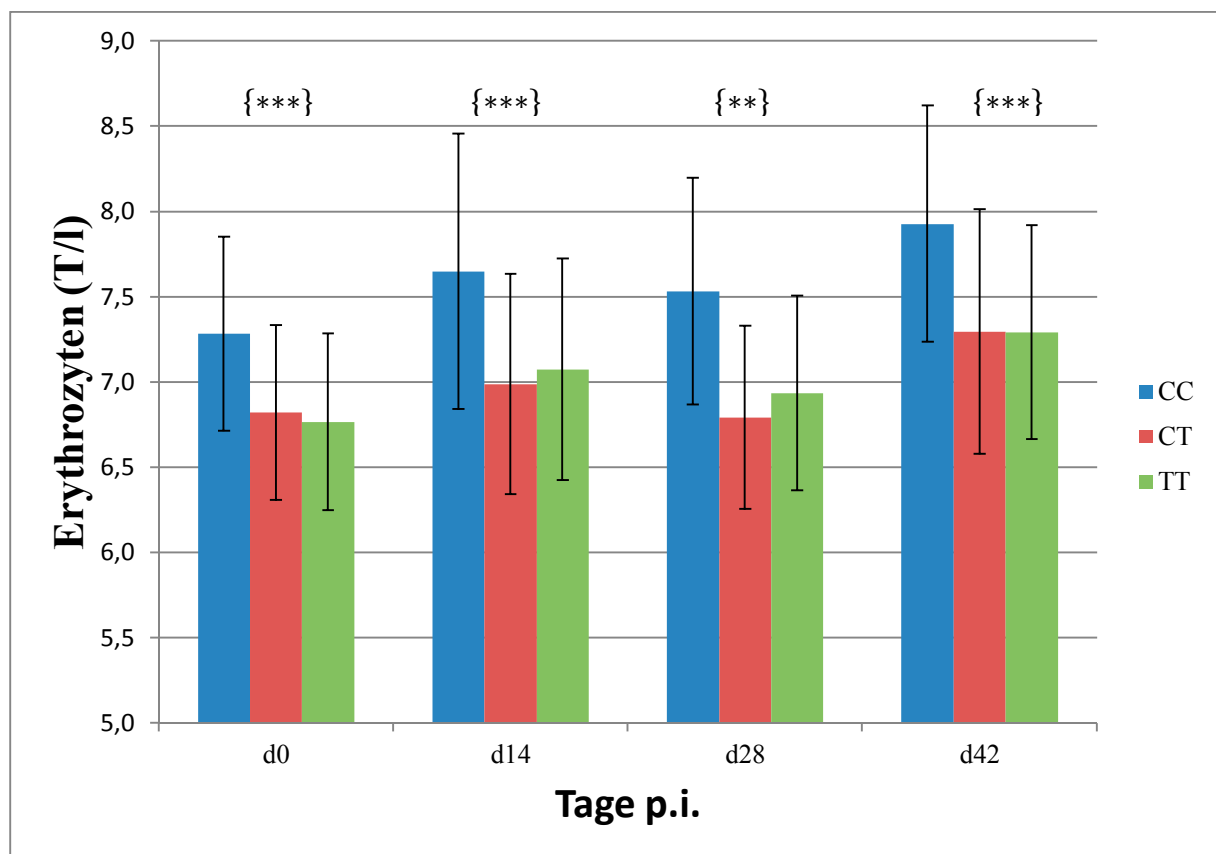
Die höchsten Signifikanzwerte zwischen den untersuchten SNPs und den Parametern des roten Blutbilds sind für SNP ERE7 zu erkennen. Hier zeigte sich sowohl für die Zeitpunkte vor der Infektion (Tag 0) als auch für die Stadien der akuten Sarkozystose (Tag 14) und für die Phase der chronischen Infektion (Tag 28 u. 42) eine deutliche Differenzierung zwischen

den Genotypen für die Parameter Erythrozytenzahl und Hämatokrit. Signifikante Unterschiede sind auch für den Parameter Hb (Hämoglobin), allerdings nur für den Zeitpunkt der chronischen Sarkozystose (Tag 28 und 42), zu erkennen.

Die Assoziation von ERE7 mit dem Parameter MCHC war zu keinem Zeitpunkt signifikant. Stattdessen konnten signifikante Zusammenhänge zwischen SNP EE2 und MCHC an Tag 0 und zwischen SNP EE11 und MCHC an Tag 42 dargestellt werden. Für die Parameter Hämoglobin und Hämatokrit zeigte sich eine signifikante Assoziation im Zusammenhang mit SNP EE11\_2 an Tag 14 p.i. und mit SNP ERE1 an Tag 42 p.i.

In Abbildung 12 ist die Assoziation von ERE7 mit der Erythrozytenzahl graphisch dargestellt. Hier ist der Zusammenhang zwischen SNP und Merkmal am größten. Die Abbildungen 13-16 zeigen jeweils die Assoziation der verschiedenen SNPs mit den Merkmalen Erythrozytenzahl, Hämatokrit, MCHC und Hämoglobingehalt.

**Abb. 12 Assoziation zwischen ERE7 und Erythrozytenzahl**



d = Tag p.i., {\*} =  $P \leq 0,05$ , {\*\*} =  $P \leq 0,01$ , {\*\*\*} =  $P \leq 0,001$

**Tabelle 19 Assoziation zwischen SNP und Hämatokrit**

Tag der Infektion	SNP Nr.	SNP Name	Gesamt	1	2	3	P
0	1	EP9_3	0,39	0,39	0,39	0,38	n.s.
	2	EP3	0,38	0,39	0,39	0,38	n.s.
	3	EP3_1	0,38		0,38	0,37	n.s.
	4	EE1b	0,39	0,38	0,39	0,39	n.s.
	6	EE11	0,39	0,39	0,39	0,38	n.s.
	5	EE11_2	0,39	0,38	0,39	0,38	n.s.
	7	EE2	0,39	0,38	0,39	0,38	n.s.
	8	ERE1	0,39	0,39	0,38		n.s.
	9	ERE1_2	0,38	0,38	0,39		n.s.
	10	ERE5	0,39	0,38	0,39	0,39	n.s.
	11	ERE7	0,39	0,38	0,38	0,4	0,048*
14	1	EP9_3	0,39	0,4	0,39	0,39	n.s.
	2	EP3	0,39	0,39	0,4	0,39	n.s.
	3	EP3_1	0,39		0,39	0,38	n.s.
	4	EE1b	0,4	0,39	0,4	0,4	n.s.
	6	EE11	0,39	0,39	0,4	0,39	n.s.
	5	EE11_2	0,39	0,39	0,4	0,38	0,031*
	7	EE2	0,39	0,38	0,39	0,4	n.s.
	8	ERE1	0,39	0,39	0,41		n.s.
	9	ERE1_2	0,39	0,39	0,41		n.s.
	10	ERE5	0,39	0,39	0,39	0,4	n.s.
	11	ERE7	0,39	0,39	0,39	0,41	n.s.
28	1	EP9_3	0,39	0,41	0,39	0,39	n.s.
	2	EP3	0,39	0,41	0,39	0,39	n.s.
	3	EP3_1	0,39		0,39	0,39	n.s.
	4	EE1b	0,39	0,39	0,39	0,4	n.s.
	6	EE11	0,39	0,39	0,39	0,4	n.s.
	5	EE11_2	0,39	0,41	0,39	0,39	n.s.
	7	EE2	0,39	0,4	0,39	0,39	n.s.
	8	ERE1	0,39	0,39	0,4		n.s.
	9	ERE1_2	0,39	0,39	0,4		n.s.
	10	ERE5	0,39	0,39	0,39	0,4	n.s.
	11	ERE7	0,39	0,39	0,38	0,41	0,001***
42	1	EP9_3	0,41	0,43	0,41	0,42	n.s.
	2	EP3	0,42	0,43	0,41	0,41	n.s.
	3	EP3_1	0,41		0,41	0,39	n.s.
	4	EE1b	0,41	0,42	0,41	0,42	n.s.
	6	EE11	0,41	0,42	0,41	0,42	n.s.
	5	EE11_2	0,41	0,43	0,41	0,41	n.s.
	7	EE2	0,41	0,42	0,41	0,41	n.s.
	8	ERE1	0,41	0,41	0,46		0,007**
	9	ERE1_2	0,41	0,41	0,44		n.s.
	10	ERE5	0,41	0,41	0,41	0,43	n.s.
	11	ERE7	0,41	0,41	0,41	0,43	0,034*

P = Signifikanz (\*<0,05, \*\*<0,01, \*\*\*<0,001), EP9\_3: 1=AA, 2=AG, 3=GG; EP3: 1=dd, 2=Dd, 3=DD; EP3\_1: 2=CT, 3=TT; EE1b: 1=DD, 2=Dd, 3=dd; EE11: 1=CC, 2=CT, 3=TT; EE11\_2: 1=AA, 2=AG, 3=GG; EE2: 1=TT, 2=TA, 3=AA; ERE1: 1=CC, 2=CT; ERE1\_2: 1=TT, 2=TG; ERE5: 1=TT, 2=CT, 3=CC; ERE7: 1=TT, 2=CT, 3=CC

**Tabelle 20 Assoziation zwischen SNP und Hämoglobingehalt**

Tag der Infektion	SNP Nr.	SNP Name	Gesamt	1	2	3	P
0	1	EP9_3	8,1	8,14	8,11	8,07	n.s.
	2	EP3	8,08	8,12	8,14	8,02	n.s.
	3	EP3_1	8,05		8,07	7,83	n.s.
	4	EE1b	8,1	8,04	8,19	8,08	n.s.
	6	EE11	8,1	8,05	8,14	8,04	n.s.
	5	EE11_2	8,11	8,11	8,18	8,02	n.s.
	7	EE2	8,1	7,85	8,09	8,13	n.s.
	8	ERE1	8,09	8,1	8,06		n.s.
	9	ERE1_2	8,09	8,08	8,19		n.s.
	10	ERE5	8,11	8	8,13	8,26	n.s.
	11	ERE7	8,1	8	8,08	8,32	n.s.
14	1	EP9_3	8,33	8,44	8,38	8,25	n.s.
	2	EP3	8,36	8,27	8,46	8,29	n.s.
	3	EP3_1	8,32		8,33	8,26	n.s.
	4	EE1b	8,37	8,27	8,48	8,42	n.s.
	6	EE11	8,33	8,18	8,46	8,23	n.s.
	5	EE11_2	8,34	8,39	8,53	8,07	0,011*
	7	EE2	8,33	7,94	8,23	8,44	n.s.
	8	ERE1	8,3	8,27	8,68		n.s.
	9	ERE1_2	8,36	8,33	8,66		n.s.
	10	ERE5	8,36	8,25	8,37	8,53	n.s.
	11	ERE7	8,33	8,24	8,25	8,68	n.s.
28	1	EP9_3	8,15	8,46	8,15	8,05	n.s.
	2	EP3	8,2	8,56	8,21	8,11	n.s.
	3	EP3_1	8,18		8,18	8,1	n.s.
	4	EE1b	8,19	8,14	8,22	8,28	n.s.
	6	EE11	8,15	8,15	8,08	8,31	n.s.
	5	EE11_2	8,16	8,45	8,16	8,08	n.s.
	7	EE2	8,15	8,11	8,11	8,18	n.s.
	8	ERE1	8,15	8,15	8,29		n.s.
	9	ERE1_2	8,2	8,2	8,2		n.s.
	10	ERE5	8,18	8,1	8,13	8,44	n.s.
	11	ERE7	8,15	8,09	8,02	8,57	0,001***
42	1	EP9_3	8,73	8,93	8,66	8,74	n.s.
	2	EP3	8,74	8,91	8,73	8,72	n.s.
	3	EP3_1	8,66		8,68	8,4	n.s.
	4	EE1b	8,75	8,71	8,78	8,76	n.s.
	6	EE11	8,73	8,73	8,68	8,85	n.s.
	5	EE11_2	8,74	8,88	8,76	8,65	n.s.
	7	EE2	8,73	8,85	8,72	8,72	n.s.
	8	ERE1	8,7	8,65	9,5		0,015*
	9	ERE1_2	8,73	8,7	9,18		n.s.
	10	ERE5	8,72	8,59	8,72	9,01	n.s.
	11	ERE7	8,73	8,61	8,66	9,12	0,025*

P = Signifikanz (\*<0,05, \*\*<0,01, \*\*\*<0,001), EP9\_3: 1=AA, 2=AG, 3=GG; EP3: 1=dd, 2=Dd, 3=DD; EP3\_1: 2=CT, 3=TT; EE1b: 1=DD, 2=Dd, 3=dd; EE11: 1=CC, 2=CT, 3=TT; EE11\_2: 1=AA, 2=AG, 3=GG; EE2: 1=TT, 2=TA, 3=AA; ERE1: 1=CC, 2=CT; ERE1\_2: 1=TT, 2=TG; ERE5: 1=TT, 2=CT, 3=CC; ERE7: 1=TT, 2=CT, 3=CC

**Tabelle 21 Assoziation zwischen SNP und Erythrozytengehalt**

Tag der Infektion	SNP Nr.	SNP Name	Gesamt	1	2	3	P
0	1	EP9_3	6,89	6,94	6,95	6,81	n.s.
	2	EP3	6,87	6,96	6,96	6,76	n.s.
	3	EP3_1	6,85		6,86	6,75	n.s.
	4	EE1b	6,88	6,78	7,01	6,85	n.s.
	5	EE11	6,89	6,83	6,93	6,89	n.s.
	6	EE11_2	6,89	6,9	6,98	6,78	n.s.
	7	EE2	6,89	6,92	6,98	6,83	n.s.
	8	ERE1	6,89	6,89	6,97		n.s.
	9	ERE1_2	6,86	6,84	7,02		n.s.
	10	ERE5	6,89	6,78	6,88	7,13	n.s.
	11	ERE7	6,89	6,77	6,82	7,28	0,001***
14	1	EP9_3	7,15	7,32	7,19	7,05	n.s.
	2	EP3	7,16	7,2	7,24	7,08	n.s.
	3	EP3_1	7,14		7,14	7,13	n.s.
	4	EE1b	7,16	7,02	7,27	7,31	n.s.
	5	EE11	7,15	7,03	7,2	7,16	n.s.
	6	EE11_2	7,14	7,26	7,28	6,92	0,026*
	7	EE2	7,15	7,15	7,16	7,14	n.s.
	8	ERE1	7,13	7,11	7,43		n.s.
	9	ERE1_2	7,14	7,12	7,42		n.s.
	10	ERE5	7,15	7,04	7,09	7,46	n.s.
	11	ERE7	7,15	7,07	6,99	7,65	0,001***
28	1	EP9_3	6,98	7,31	7,02	6,84	0,033*
	2	EP3	7,01	7,43	7,02	6,88	n.s.
	3	EP3_1	7		7	6,95	n.s.
	4	EE1b	6,97	6,91	6,99	7,15	n.s.
	5	EE11	6,98	6,97	6,89	7,23	n.s.
	6	EE11_2	6,99	7,29	6,98	6,89	n.s.
	7	EE2	6,98	7,32	7,09	6,89	n.s.
	8	ERE1	7	7	7,05		n.s.
	9	ERE1_2	6,99	6,99	6,98		n.s.
	10	ERE5	6,99	6,9	6,91	7,35	0,023*
	11	ERE7	6,98	6,94	6,79	7,53	0,001**
42	1	EP9_3	7,41	7,64	7,4	7,35	n.s.
	2	EP3	7,41	7,67	7,4	7,34	n.s.
	3	EP3_1	7,36		7,39	7,1	n.s.
	4	EE1b	7,39	7,31	7,41	7,6	n.s.
	6	EE11	7,41	7,41	7,32	7,63	n.s.
	5	EE11_2	7,41	7,62	7,44	7,3	n.s.
	7	EE2	7,41	7,79	7,52	7,3	n.s.
	8	ERE1	7,42	7,38	8,1		0,034*
	9	ERE1_2	7,39	7,37	7,72		n.s.
	10	ERE5	7,4	7,25	7,39	7,73	n.s.
	11	ERE7	7,41	7,29	7,3	7,93	0,001***

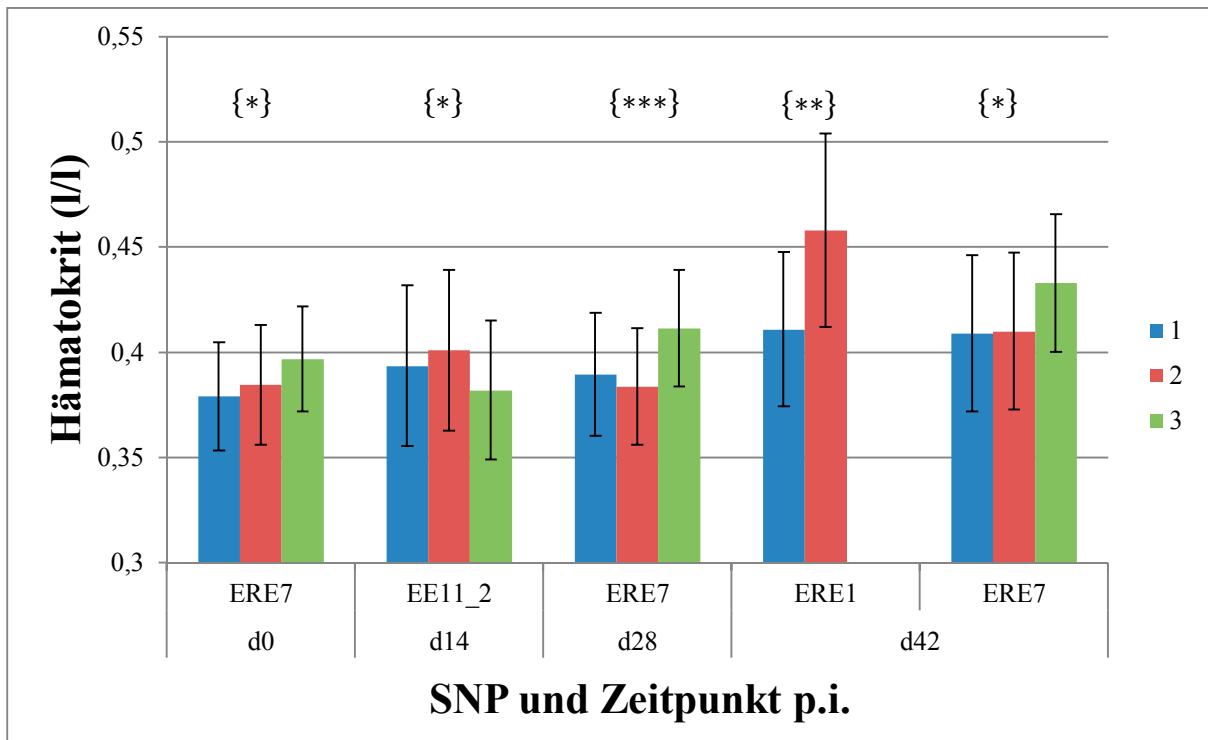
P = Signifikanz (\* $\leq 0,05$ , \*\* $\leq 0,01$ , \*\*\* $\leq 0,001$ ), EP9\_3: 1=AA, 2=AG, 3=GG; EP3: 1=dd, 2=Dd, 3=DD, EP3\_1: 2=CT, 3=TT; EE1b: 1=DD, 2=Dd, 3=dd; EE11: 1=CC, 2=CT, 3=TT; EE11\_2: 1=AA, 2=AG, 3=GG; EE2: 1=TT, 2=TA, 3=AA; ERE1: 1=CC, 2=CT; ERE1\_2: 1=TT, 2=TG; ERE5: 1=TT, 2=CT, 3=CC; ERE7: 1=TT, 2=CT, 3=CC

**Tabelle 22 Assoziation zwischen SNP und MCHC**

Tag der Infektion	SNP Nr.	SNP Name	Gesamt	1	2	3	P
0	1	EP9_3	21,06	21,11	21,09	21,02	n.s.
	2	EP3	21,1	21,06	21,12	21,09	n.s.
	3	EP3_1	21,17		21,14	21,4	n.s.
	4	EE1b	21,06	21,07	21,11	20,89	n.s.
	6	EE11	21,06	20,91	21,11	21,17	n.s.
	5	EE11_2	21,07	21,08	21,1	21,02	n.s.
	7	EE2	21,06	20,56	20,91	21,22	0,001***
	8	ERE1	21,06	21,06	21,06		n.s.
	9	ERE1_2	21,07	21,06	21,21		n.s.
	10	ERE5	21,08	21,06	21,11	21,02	n.s.
	11	ERE7	21,06	21,13	21,06	20,96	n.s.
14	1	EP9_3	21,34	21,33	21,36	21,31	n.s.
	2	EP3	21,33	21,3	21,28	21,4	n.s.
	3	EP3_1	21,27		21,22	21,71	n.s.
	4	EE1b	21,33	21,47	21,2	21,18	n.s.
	6	EE11	21,34	21,29	21,37	21,33	n.s.
	5	EE11_2	21,35	21,36	21,48	21,17	n.s.
	7	EE2	21,34	20,63	21,24	21,48	n.s.
	8	ERE1	21,25	21,26	21,17		n.s.
	9	ERE1_2	21,39	21,41	21,13		n.s.
	10	ERE5	21,38	21,31	21,51	21,21	n.s.
	11	ERE7	21,34	21,32	21,4	21,22	n.s.
28	1	EP9_3	20,91	20,88	20,84	21	n.s.
	2	EP3	20,92	20,82	20,82	21,05	n.s.
	3	EP3_1	20,86		20,85	21	n.s.
	4	EE1b	20,87	20,94	20,85	20,72	n.s.
	6	EE11	20,91	20,92	20,89	20,95	n.s.
	5	EE11_2	20,92	20,91	20,97	20,86	n.s.
	7	EE2	20,91	20,39	20,78	21,05	n.s.
	8	ERE1	20,85	20,86	20,74		n.s.
	9	ERE1_2	20,93	20,94	20,75		n.s.
	10	ERE5	20,93	20,71	21,13	20,89	n.s.
	11	ERE7	20,9121	20,74	21,07	20,84	n.s.
42	1	EP9_3	21,1802	20,99	21,31	21,1	n.s.
	2	EP3	21,1448	20,88	21,22	21,12	n.s.
	3	EP3_1	21,1652		21,12	21,54	n.s.
	4	EE1b	21,144	21,1	21,29	20,9	n.s.
	6	EE11	21,1802	20,98	21,3	21,16	0,05*
	5	EE11_2	21,1914	20,95	21,31	21,11	n.s.
	7	EE2	21,1802	20,85	21,15	21,24	n.s.
	8	ERE1	21,149	21,17	20,76		n.s.
	9	ERE1_2	21,1347	21,14	21,02		n.s.
	10	ERE5	21,1895	21,05	21,32	21,15	n.s.
	11	ERE7	21,1802	21,12	21,27	21,06	n.s.

P = Signifikanz (\*≤0,05, \*\*≤0,01, \*\*\*≤0,001), EP9\_3: 1=AA, 2=AG, 3=GG; EP3: 1=dd, 2=Dd, 3=DD; EP3\_1: 2=CT 3=TT; EE1b: 1=DD, 2=Dd, 3=dd; EE11: 1=CC, 2=CT, 3=TT; EE11\_2: 1=AA, 2=AG, 3=GG; EE2: 1=TT, 2=TA, 3=AA; ERE1: 1=CC, 2=CT; ERE1\_2: 1=TT, 2=TG; ERE5: 1=TT, 2=CT, 3=CC; ERE7: 1=TT, 2=CT, 3=CC

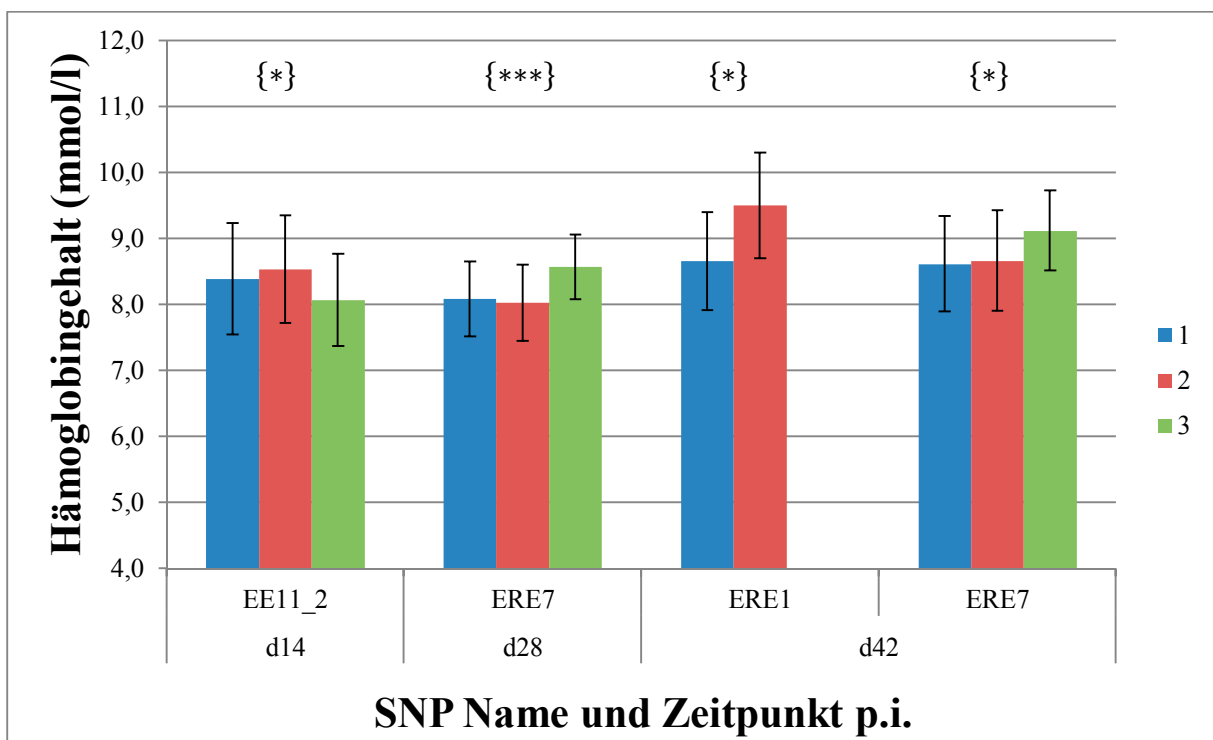
**Abb. 13** Signifikante Assoziationen zwischen SNPs und Hämatokrit



d = Tag p.i.; {\*} =  $P \leq 0,05$ ; {\*\*} =  $P \leq 0,01$ ; {\*\*\*} =  $P \leq 0,001$

EE11\_2: 1=AA, 2=AG, 3=GG; ERE7: 1=TT, 2=CT, 3=CC; ERE1: 1=CC, 2=CT

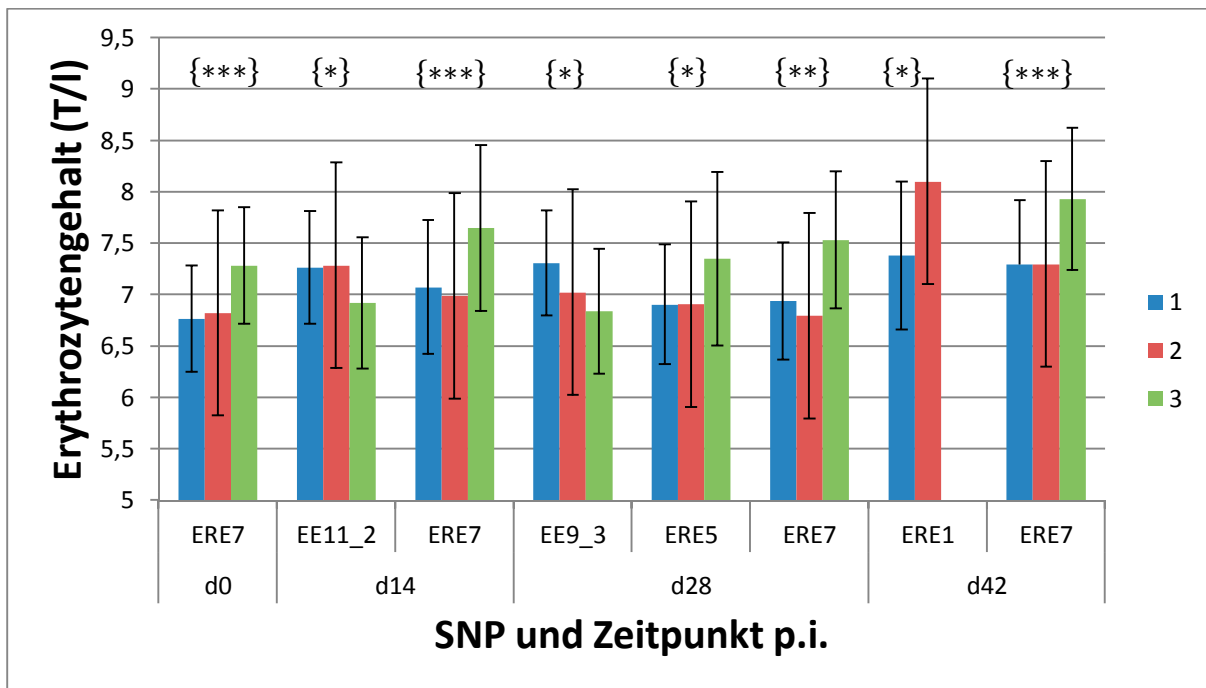
**Abb. 14** Signifikante Assoziationen zwischen SNPs und Hämoglobingehalt



d = Tag p.i.; {\*} =  $P \leq 0,05$ ; {\*\*} =  $P \leq 0,01$ ; {\*\*\*} =  $P \leq 0,001$

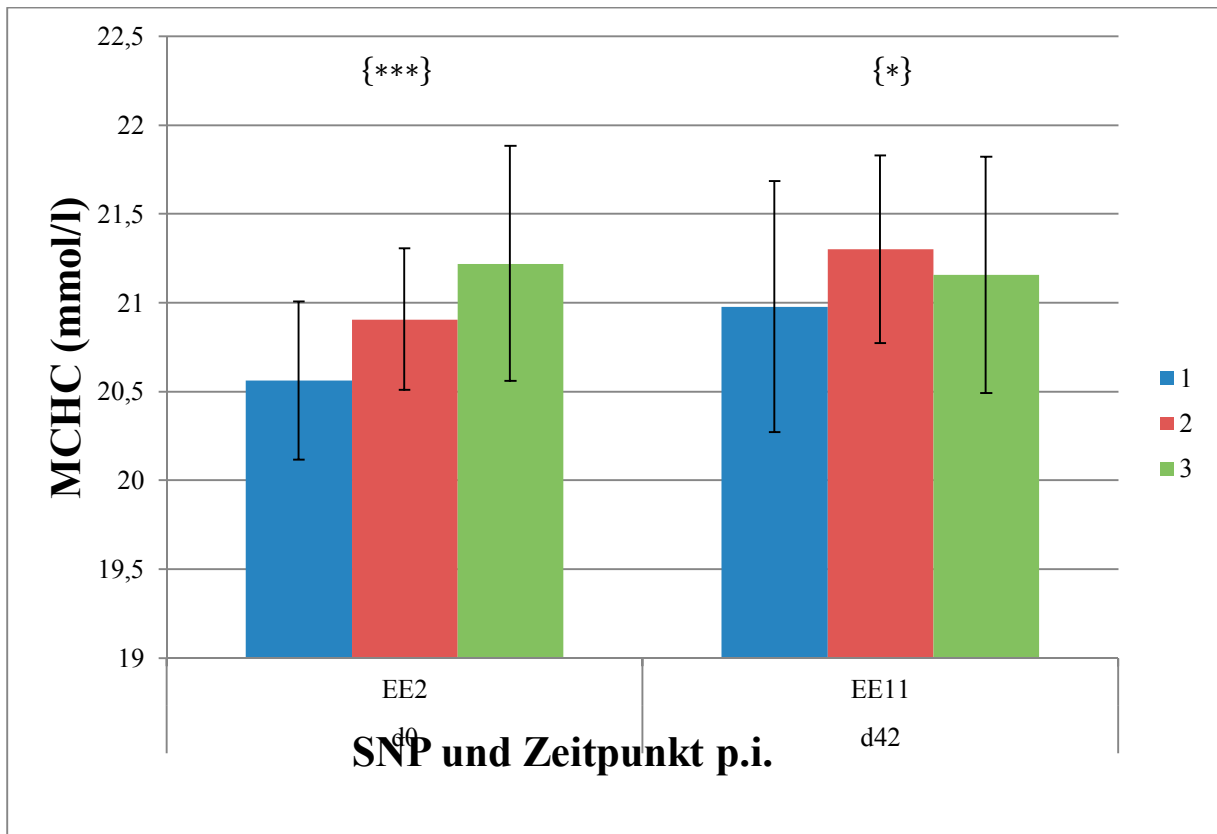
EE11\_2: 1=AA, 2=AG, 3=GG; ERE7: 1=TT, 2=CT, 3=CC; ERE1: 1=CC, 2=CT

**Abb. 15** Signifikante Assoziationen zwischen SNPs und Erythrozytenzahl



d = Tag p.i.; {\*} =  $P \leq 0,05$ ; {\*\*} =  $P \leq 0,01$ ; {\*\*\*} =  $P \leq 0,001$ ; ERE7: 1=TT, 2=CT, 3=CC; EE11\_2: 1=AA, 2=AG, 3=GG; EP9\_3: 1=AA, 2=AG, 3=GG; ERE5: 1=TT, 2=CT, 3=CC; ERE1: 1=CC, 2=CT

**Abb. 16** Signifikante Assoziationen zwischen SNPs und MCHC



d = Tag p.i.; {\*} =  $P \leq 0,05$ ; {\*\*} =  $P \leq 0,01$ ; {\*\*\*} =  $P \leq 0,001$ ; EE2: 1=TT, 2=TA, 3=AA; EE11: 1=CC, 2=CT, 3=TT

#### 4.6 Kartierung von EPOR auf SSC 2 und Erythropoetin auf SSC3

Das EPOR-Gen wurde mittels Kopplungsanalyse zwischen die Marker Sw1650 und Sw240 kartiert. Der Abstand zu Sw1650 beträgt 15 cM, zu dem Marker Sw240 20 cM.

Das EPO-Gen wurde mit Hilfe der Kopplungsanalyse 15 cM vor dem Marker Sw72 kartiert.

#### 4.7 QTL-Analyse

Für die QTL-Analyse wurden insgesamt fünf der elf untersuchten SNPs ausgewählt. Vier befinden sich im Erythropoetin-Gen bzw. dessen Promotor (EE2, EE11, EE11\_2, EP9\_3).

Ein SNP liegt im Epo-Rezeptor-Gen (ERE7).

ERE1 wurde trotz der dargestellten Signifikanzen für die Parameter Hämoglobin, Erythrozytenzahl und Hämatokrit nicht berücksichtigt, da hier eine Ungleichverteilung der Genotypen sowohl in der F0- als auch in der F2-Generation vorlag. Der Genotyp TT fehlte in beiden Populationen vollständig. Bei der Detektion merkmalsbestimmender Genvarianten ist es jedoch von Vorteil, wenn in der Parenteralgeneration zwei verschiedene homozygote Genotypen vorhanden sind, die sich in ihrer Merkmalsausprägung möglichst weit unterscheiden. Die heterozygoten Tiere liegen im Idealfall in ihrer Merkmalsausprägung zwischen den Homozygoten. Da für ERE1 in der Parenteralgeneration jedoch nur die Genotypen CC und CT auftraten und der Genotyp TT fehlte, war davon auszugehen, dass es sich bei diesem SNP nicht um den gesuchten QTN handelt.

ERE5 wurde wegen seiner eher geringen Signifikanz im Zusammenhang mit der Erythrozytenzahl an Tag 28 ebenfalls nicht weiter untersucht, da auch hier nicht zu erwarten war, dass er den gesuchten QTN darstellt.

Von den fünf untersuchten SNPs hat ERE7 den größten Einfluss auf die QTL der verschiedenen untersuchten Parameter. Die größten Änderungen der F-Werte zeigen sich für den Gehalt der roten Blutzellen. Jedoch können auch für die Werte des Hämatokrits und des Hämoglobingehalts positive Effekte gemessen werden. Für die Werte von MCHC allerdings konnten keine F-Wert-Veränderungen verzeichnet werden.

Der F-Wert für den Erythrozytengehalt steigt bereits vor der Infektion (Tag 0) unter Berücksichtigung von ERE7 von 3,09 auf 9,19. Eine Zunahme des F-Werts ist zum Zeitpunkt der akuten Sarkozystose (Tag 14) ebenfalls festzustellen. Er steigt von 1,76 auf 8,25. Die größte Änderung ist jedoch an Tag 28 p.i. zu verzeichnen. Hier steigt der errechnete QTL von 2,84 auf genomweit signifikante 13,14 an. Die Änderung des F-Werts zum Zeitpunkt der chronischen Infektion (Tag 42) steigt dagegen im Vergleich nur in geringem Umfang von

3,33 auf 8,84 (siehe Tab. 23). In den Abbildungen 17-20 sind die Effekte auf den F-Wert für die verschiedenen Parameter des roten Blutbilds graphisch dargestellt. Auch hier zeigt sich der deutliche Anstieg der F-Werte für den Erythrozytengehalt, Hämatokrit und Hämoglobin zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion. Allerdings wird in dieser Darstellung auch deutlich, dass die F-Werte zu den Zeitpunkten 0, 28, und 42 direkt über SNP ERE 7 einbrechen und der jeweils höchste F-Wert nicht direkt über dem SNP liegt.

Die Effekte der SNPs im Erythropoetin-Gen sind vergleichsweise eher gering. Die größte Veränderung findet sich an Tag 14 für die Parameter Hämoglobin und den Erythrozytengehalt unter Berücksichtigung von EE11\_2. Hier steigt der F-Wert für den Hämoglobingehalt von 3,29 auf 6,85. Der F-Wert für den Erythrozytengehalt ändert sich von 1,6 auf 4,54 (siehe Tab. 24).

**Tabelle 23 F-Wert Änderung durch ERE7 auf SSC2**

Merkmal	Tag p.i.	F-Wert	F-Wert mit
		(ohne SNP)	ERE7
Hb	0	3,8	4,74
	14	2,86	2,86
	28	3,02	5,52
	42	4,08	5,35
Ery	0	3,09	9,18
	14	1,76	8,25
	28	2,84	13,14
	42	3,33	8,84
Hkt	0	3,47	5,25
	14	3,35	3,35
	28	2,32	3,91
	42	5,52	6,58
MCHC	0	2,38	2,38
	14	1,66	1,66
	28	1,8	1,8
	42	3,93	3,93

Hb: Hämoglobin, Ery: Erythrozytenzahl, Hkt: Hämatokrit, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration

**Tabelle 24 F-Wert Änderung durch SNPs auf SSC3**

Merkm <sup>al</sup>	Tag p.i.	F-Wert (ohne SNP)	F-Wert mit EE2	F-Wert mit EE11	F-Wert mit EE11_2	F-Wert mit EP9_3
Hb	0	1,77	3,47	1,81	2,79	2,56
	14	3,29	4,96	3,29	6,86	3,85
	28	2,78	2,78	2,78	3,64	2,78
	42	2,53	2,53	2,53	2,53	2,53
Ery	0	1,38	1,38	1,38	1,83	1,38
	14	1,61	1,61	1,61	4,55	2,43
	28	2,68	2,68	2,68	2,68	2,68
	42	1,67	1,67	1,87	2,29	1,67
Hkt	0	0,96	1,77	0,96	1,68	0,96
	14	3,97	4,96	3,97	5,55	3,97
	28	3,89	3,89	3,89	3,89	3,89
	42	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65
MCHC	0	2,16	2,16	2,16	2,16	3,86
	14	0,52	0,68	0,53	1,19	0,52
	28	2,21	2,21	2,21	2,21	2,21
	42	0,76	0,76	2,38	1,89	0,76

HB: Hämoglobin, Ery: Erythrozytenzahl, Hkt: Hämatokrit, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration

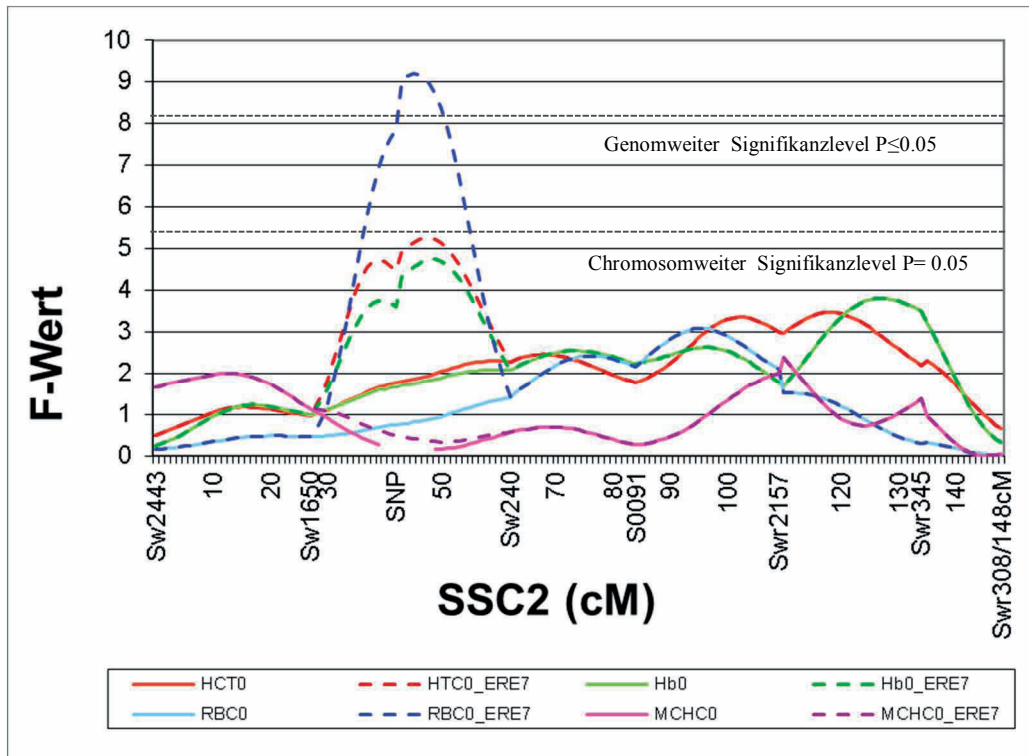


Abb.17 QTL für Hämatokrit, Hämoglobin, RBC und MCHC auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung von SNP ERE7 an Tag 0

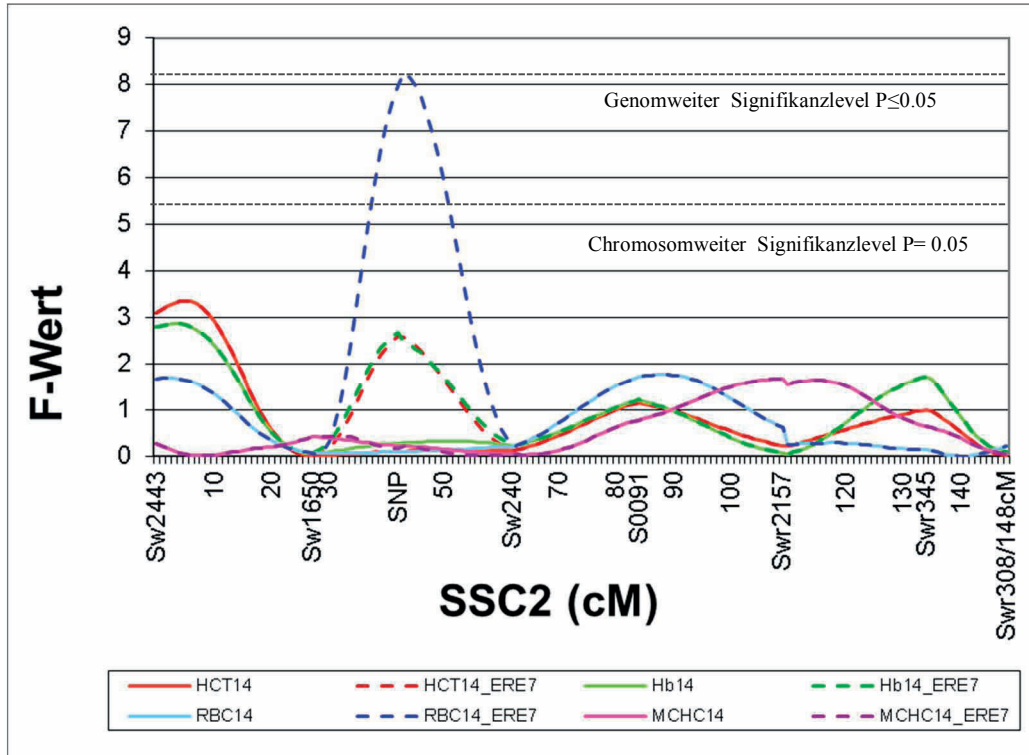


Abb.18 QTL für Hämatokrit, Hämoglobin, RBC und MCHC auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung von SNP ERE7 an Tag 14

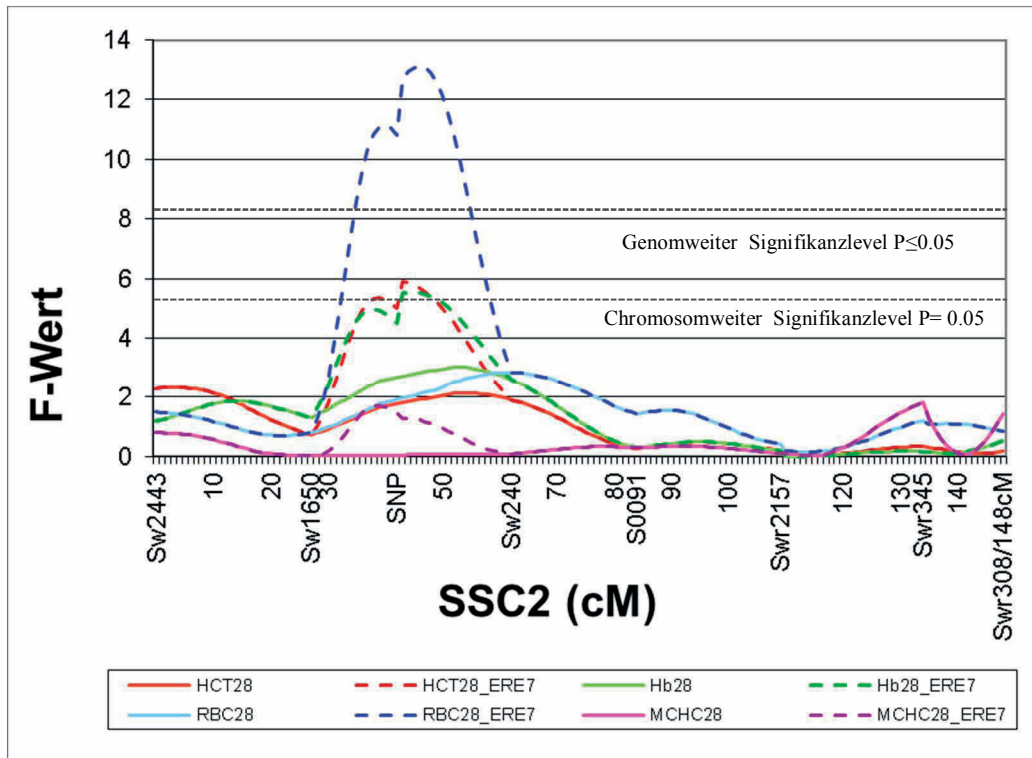


Abb. 19 QTL für Hämatokrit, Hämoglobin, RBC und MCHC auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung von ERE7 an Tag 28

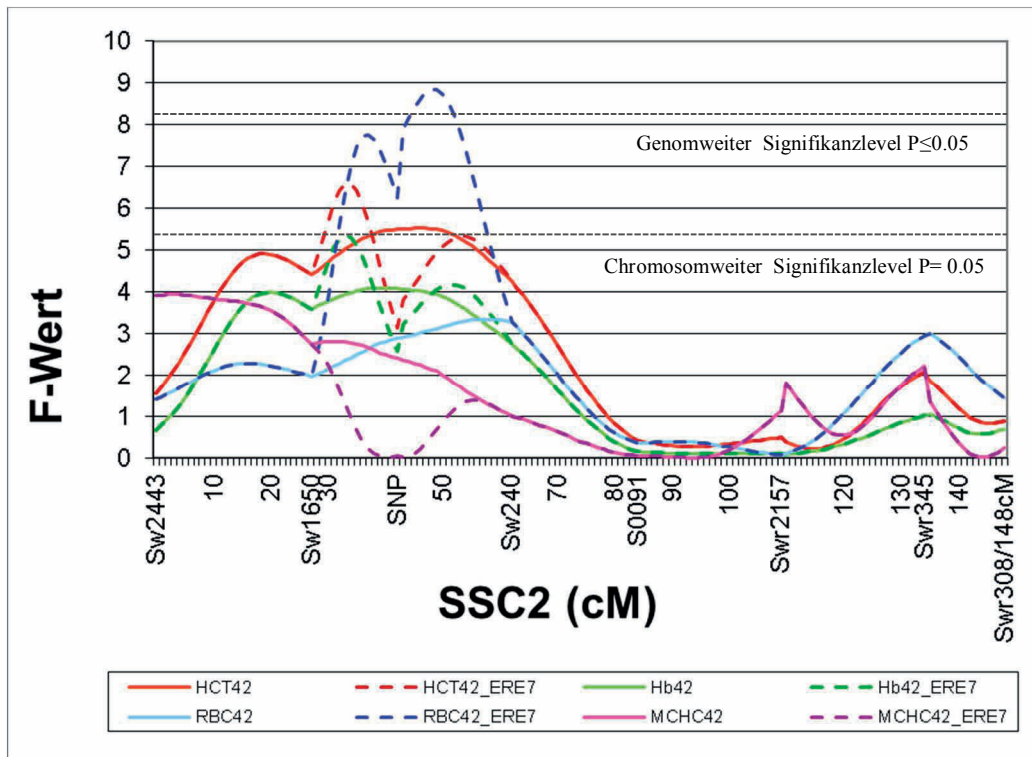


Abb. 20 QTL für Hämatokrit, Hämoglobin, RBC und MCHC auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung von ERE7 an Tag 42

#### **4.8 Auswahl der SNPs für die kommerzielle Population**

Die höchsten Signifikanzwerte der untersuchten SNPs sowohl in EPO als auch EPOR zeigt ERE7. Dieser SNP wurde daher für die weitere Analyse in der kommerziellen Population ausgewählt. Außerdem wurden die Genotypen der Tiere aus der kommerziellen Population für die SNPs EE11\_2, EE2 und ERE1 detektiert, da hier hohe Signifikanzwerte zu verzeichnen waren, bzw. die SNPs mit den Werten mehrerer Parameter des roten Blutbildes korrelieren.

Die SNPs EE11 und EP9\_3 wurden in nachfolgende Untersuchungen nicht mehr einbezogen, da sie lediglich mit je einem Parameter des roten Blutbilds und auch nur am Tag 28, bzw. 42 p.i. eine einfache Signifikanz aufweisen.

#### **4.9 Genotypen der kommerziellen Population**

In der kommerziellen Population kamen die Genotypen von ERE7 mit einer Verteilung von 26,9% (CC), 50,9% (CT=heterozygote Tiere) und 22,2% (TT) vor (Tab. 25). Damit liegt die Häufigkeit des Meishan-Allels (C) in dieser Population bei 52,3% und die des Pietrain-Allels (T) bei 47,7%; dies entspricht einem Verhältnis von nahezu 1:1. Das bedeutet, dass beide Allele zu gleichen Anteilen in der Population existent sind. Dieses Ergebnis entspricht einer idealen Verteilung der Allelfrequenzen.

An den Positionen der SNPs EE11\_2, EE2 und ERE1 waren in der kommerziellen Population fast ausschließlich die Pietrain-Allele vertreten. Über 90% der Tiere sind homozygot für die bei Pietrain vorherrschenden Genotypen. Die Allelfrequenz der Pietrain-Allele liegt bei allen drei SNPs bei über 95% (siehe Tabelle 25). Aufgrund dieses ungleichen Verhältnisses der Genotypen innerhalb der kommerziellen Population wurden diese drei SNPs nicht mehr in die nachfolgende Assoziationsstudie mit einbezogen. Es war hier nicht zu erwarten, dass sich signifikante Korrelationen mit den Parametern des roten Blutbilds analog der untersuchten F2-Generation darstellen lassen.

**Tabelle 25 Genotypen und Allelfrequenzen (in %) in der kommerziellen Population für SNPs EE11\_2, EE2, ERE1, und ERE7**

SNP	Genotypen			Allelfrequenz	
				Meishan-Allel	Pietrain-Allel
EE11_2	GG 0	AG 9,1	AA 90,9	G 4,5	A 95,5
EE2	AA 95,5	TA 1,8	TT 2,7	T 3,6	A 96,4
ERE1	CC 92,7	CT 7,3	TT 0	T 3,6	C 96,4
ERE7	CC 26,9	CT 50,9	TT 22,2	C 52,3	T 47,7

A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin

**4.10 Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp in der kommerziellen Population unter Einbeziehung von SNP ERE7**

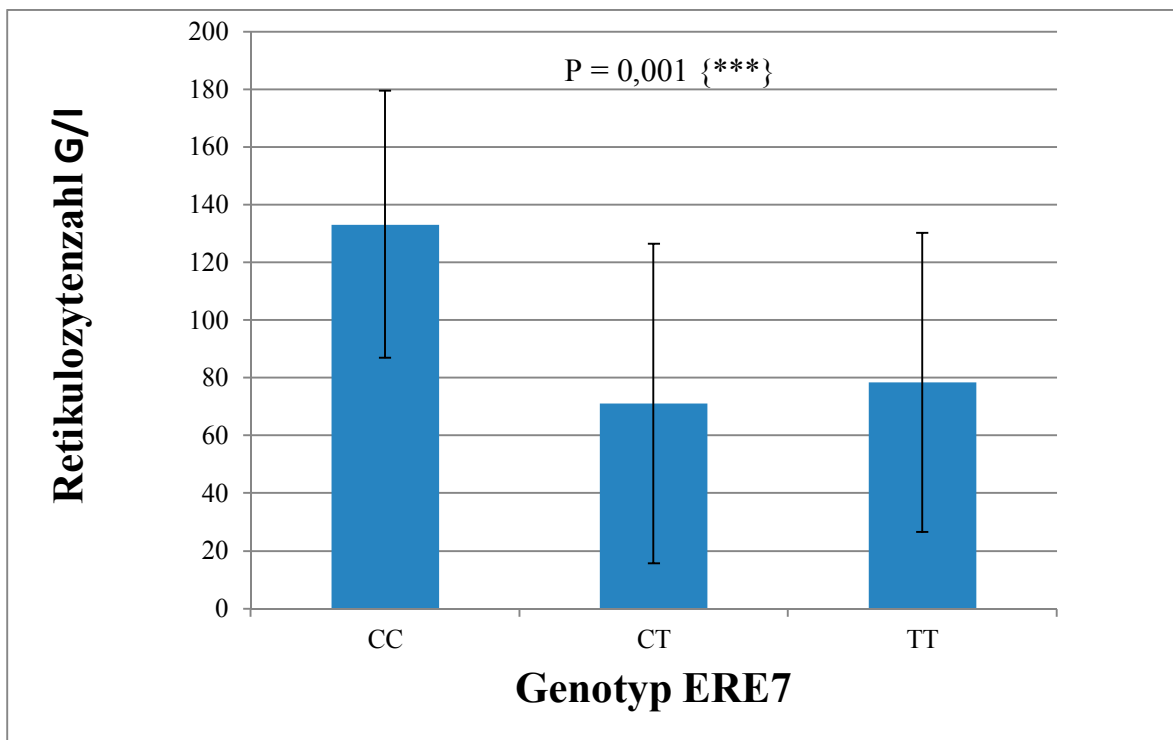
Für SNP ERE7 konnten in der kommerziellen Population signifikante Assoziationen mit Parametern des roten Blutbilds festgestellt werden. Die Tiere des Genotyps CC haben signifikant höhere Werte für Hämatokrit, Hämoglobingehalt, Retikulozytenzahl, CHR, MCV bei gleichzeitig niedrigeren Werten für MCHC, RDW und CHCM. Dabei werden Signifikanzwerte <0,001 für Hämatokrit, Retikulozytenzahl, MCV, MCHC und CHCM erreicht. Auch bei der Erythrozytenzahl ist eine Tendenz zu höheren Werten bei Tieren mit dem Genotyp CC zu erkennen. Das Signifikanzniveau von  $P < 0,5$  konnte hier allerdings nicht erreicht werden. (siehe Anhang)

**Tabelle 26 Veränderungen der Mittelwerte der Parameter des roten Blutbildes unter Berücksichtigung der Genotypen für SNP ERE7 in der kommerziellen Population und im Vergleich zu Normwerten beim Schwein**

	CC	CT	TT	P	Normwerte*
RBC	7,1	6,9	6,8	n.s.	5,8-8,1 T/l
HB	7,4	7,2	7,1	n.s.	6,7-9,2 mmol/l
HTC	0,43	0,39	0,38	<0.001	0,33-0,45 l/l
RETIS	133,2	71,1	78,4	0.001	—
MCV	61,4	57,6	55,5	0.001	50-65 fl
MCH	1,07	1,08	1,06	n.s.	1,1-1,4 fmol
MCHC	17,4	18,8	19,1	<0.001	16,7-22 mmol/l

\*: nach Kraft/Dürr; C: Cytosin, T: Thymin, P: Signifikanz

RBC: red blood cells, HB: Hämoglobin, HTC: Hämatokrit, RETIS: Retikulozyten, MCV: mittleres korpuskuläres Volumen, MCH: mittleres korpuskuläres Hämoglobin, MCHC: mean cell hemoglobin concentration



**Abb. 21 Mittelwerte und Standardabweichung für die Retikulozytenzahl innerhalb der Genotypen von ERE7 in der kommerziellen Population**

C = Cytosin, T= Thymin, P= Signifikanz, {\*\*\*}: P≤0,001

## 5 Diskussion

### 5.1 Bedeutung der genetischen Krankheitsresistenz für die Nutztierzucht

In den kommerziellen Schweinehaltungen stellt das Auftreten von Infektionskrankheiten ein großes Problem dar. Der Infektionsdruck ist aufgrund der Haltungsdichte permanent hoch. Klinisch inapparent infizierte Tiere sind für die Ausbreitung von Erregern in und zwischen den Beständen verantwortlich. Stress, Transport, Umstallung, und viele andere Faktoren verstärken das Problem zusätzlich. Wirtschaftliche Einbußen sind durch verminderte Futtermittelverwertung, geringere tägliche Zunahme der Masttiere und dem damit verbundenen geringeren Schlachtendgewicht oder durch das Auftreten von Tierverlusten zu erwarten.

Ein Ansatz dieses Problem zu lösen wäre die Zucht von krankheitsresistenten Tieren. Bei einigen Nutztieren sind bereits natürliche Resistenzen gegen verschiedene Erkrankungen bekannt. Sie beziehen sich auf bakterielle, virale und parasitäre Erkrankungen (siehe Kap. 2.3). Die dazugehörigen merkmalsbestimmenden Genvarianten sind allerdings zum großen Teil noch nicht identifiziert. Daher ist die tatsächliche tierzüchterische Nutzung von Resistenzunterschieden bisher nur in geringem Umfang möglich. Ein noch weit gestecktes Ziel ist, die mit den Krankheitsresistenzen verbundenen merkmalsbestimmenden Genvarianten zu identifizieren, um so die Zuchttiere gezielt auf entsprechende Merkmale selektieren zu können.

Bei Schweinen treten häufig Anämien auf, die entweder die direkte Krankheitsursache oder ein Begleitsymptom einer anderen Primärerkrankung sein können. Im Hinblick auf die Zucht krankheitsresistenter Individuen wäre es daher hilfreich, wenn im Zusammenhang mit Anämien Genvarianten identifiziert würden, die tierzüchterisch eingesetzt werden könnten. Erste Hinweise auf unterschiedliche Empfindlichkeiten zur Entwicklung einer Anämie ergaben sich aus einem Forschungsprojekt zur Resistenz/Empfindlichkeit gegen den Parasiten *S. miescheriana* (Reiner et al. 2002a). Dabei zeigten sich QTL mit Auswirkungen auf die Blutbildung beim Schwein (Reiner et al., 2007), die auch von anderen Gruppen bestätigt wurden (Wattrang et al., 2005, Zou et al. 2008, Gong et al. 2010, Cho et al. 2011a). Es existieren in der Zwischenzeit auch einige SNPs, die mit Parametern des roten Blutbilds korrelieren (Sakurai et al. 1996, Luo et al. 2012, Wang et al. 2013, Zhang et al. 2013, Zhang et al. 2014, Jung et al. 2014), jedoch liegt keiner der bisher bekannten SNPs in den homolog-physiologischen Kandidatengen EPO und EPOR. Auch kann keiner dieser SNPs bisher tierzüchterisch genutzt werden. Dabei könnte ein verbessertes Blutbildungsvermögen die

Resistenzlage gegenüber Infektionskrankheiten, die zu einer vorübergehenden Belastung des Blutbildungsvermögens führen, steigern und die Rekonvaleszenz fördern. In der hier vorliegenden Arbeit sollten deshalb die Kandidatengene EPO und EPOR auf merkmalsbestimmende Genvarianten untersucht werden, die im Zusammenhang mit der Blutbildung stehen.

## 5.2 Die molekulare Basis der Genregulierung in der Erythropoese

Die Erythropoese ist ein komplexer Vorgang im Organismus. Theoretisch können Mutationen in allen Genen, deren Transkriptionsprodukte an der Erythropoese beteiligt sind, Einfluss auf die Parameter des roten Blutbildes nehmen. Außerdem können merkmalsverändernde Genvarianten in allen Bereichen der beteiligten Gene liegen. Insbesondere der Promotorbereich ist für die Effizienz der Transkription und damit im Endeffekt die Anzahl der gebildeten Proteine verantwortlich. Hier finden sich neben Sequenzen, die für die Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes notwendig sind, auch weitere Sequenzen, die die Genaktivität regulieren.

An der Transkription der Kandidatengene EPO und EPOR sind insbesondere die Transkriptionsfaktoren GATA (Zon et al. 1991, Imagawa et al. 1997, Tsuchiya et al. 1997, Dame et al. 2003), SCL/Tal1 (Aplan et al. 1992, Rogers et al. 2012), speziell für Erythropoetin auch die Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF) und HNF-4 beteiligt (Semenza et al. 1992, Galson et al. 1995, Wang et al. 1992, Scortegagna et al. 2005, Rankin et al. 2007, Kapitsinou et al. 2010). Dabei ist GATA-1 als DNA-bindendes Protein in die Bildung des Transkriptionsinitiationskomplexes involviert. SCL/Tal1 wirkt als co-aktivierender Faktor; HIF und HNF-4 wirken regulierend im Zusammenhang mit dem Sauerstoffgehalt des Blutes.

Um den Sachverhalt der vielen bereits bekannten Regulationselemente innerhalb der Gene zu berücksichtigen und gleichzeitig auf möglichst viele Einflussfaktoren einzugehen, sollte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu den bekannten Exon- und Intronbereichen eine umfangreiche Analyse der Promotorregion auf merkmalsbestimmende Genvarianten durchgeführt werden. Die Sequenzen der Promotorregionen beider Gene waren zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht bekannt. Deshalb mussten sowohl die Promotorsequenzen beider Gene als auch die 3'UTR-Region des EPO-Gens mit Hilfe von BACs identifiziert werden. Mit ihrer Hilfe war es zwar möglich hinreichend lange Sequenzen zu untersuchen, allerdings deckte der eingesetzte BAC CH242-272A5 nur 1468 bp in 5'-Richtung des EPOR-Gens ab und es konnte kein weiterer BAC identifiziert werden, mit dem diese Lücke

geschlossen werden konnte. Da beim Schwein bisher keine Promotorstudien von EPO und EPOR durchgeführt wurden und diese auch nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, ist über die genaue Lokalisation der Regulationselemente bei der Tierart Schwein bis heute nichts bekannt. Beim Menschen und der Maus liegen die wichtigsten Regulationselemente der Gene EPO und EPOR allerdings unweit vom Transkriptionsstartpunkt entfernt (Yousouffian et al. 1990, Naguchi et al. 1991). Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Gensequenzen zwischen den Tierarten, sowohl in codierenden wie auch nicht codierenden Bereichen (Jones et al. 1990, Wen et al. 1993), ist davon auszugehen, dass auch beim Schwein relevante Regulationselemente in ähnlichen Positionen liegen und dass diese in den Untersuchungen mit erfasst wurden. Dies gilt insbesondere in der Promotorsequenz von EPO. Hier wurde aufgrund der umfangreichen Analyse der Bereich mit dem minimalen Promotor, dem GATA-Motiv und der HAF-Bindungsstelle mit Hilfe der Sequenz von BAC242-137H mit großer Sicherheit abgedeckt; ebenso die GATA-Box und ein Sp1-Motiv in EPOR, welche bei Maus und Mensch nur 150 bp vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegen (Yousouffian et al. 1990). Die CACCC-Motive des Menschen liegen zwischen 585 und 1906 bp in 5'-Richtung von EPOR; die der Maus etwas näher am Startcodon (Noguchi et al. 1991). Der beim Menschen relevante Bereich bis 1906 bp proximal des Transkriptionsstartpunkts in EPOR konnte mit der Sequenz von BAC242-137H zwar nicht vollständig abgedeckt werden, die eingesetzte Sequenz mit 1468 bp in 5'-Richtung enthält aber an Position c.-180 ein inverses GATA1-Motiv (TTATCT) analog des Menschen und weitere 70bp vor dem Transkriptionsstartpunkt ist ein CACCC-Motiv erkennbar. Das Sp1 Motiv (CCGCCC) liegt in der untersuchten Sequenz 152 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt.

Der Enhancer KIE bzw. NRE im EPO-Gen kann auch bei der Maus je nach Zelllinie unterschiedlich an verschiedenen Positionen in der Promotorregion liegen (Übersicht in Stockmann und Fandrey 2006). Hier ist über die genaue Lokalisation der Regulationselemente bei der Tierart Schwein bis heute nichts bekannt. Es ist also noch gar nicht definitiv geklärt, ob entsprechende Regulationselemente auch beim Schwein in gleicher Form existieren und es ist auch nicht bekannt wo genau sie in den Blutzellen des Schweins liegen. Es ist daher zwar nicht möglich eine definitive Aussage darüber zu treffen, welche Enhancerlemente mit den vorliegenden Untersuchungen tatsächlich eingeschlossen wurden; allerdings sollte die umfangreiche Promotoranalyse mit Hilfe von BAC CH242-137H alle relevanten Regulationselemente enthalten.

### 5.3 Bekannte genetische Variationen mit Einfluss auf die Blutbildung

Beim Menschen sind verschiedene Erbdefekte bekannt, die zum Krankheitsbild einer Polyzythämie führen. Man unterscheidet hier zwischen der Polyzythemia vera, die durch Mutationen der Januskinase-2 hervorgerufen wird, also einer Mutation in einem Protein der Signalkaskade am Epo-Rezeptor, und im Gegensatz dazu die primäre familiäre und kongenitale Polyzythämie (PFCP), welche durch Mutationen direkt im EPOR-Gen entsteht. Die Mutationen in EPOR, die zur Ausbildung einer PFCP führen, bewirken meist, dass ein c-terminal verkürzter Epo-Rezeptor gebildet wird, dem die negativ regulierenden Domänen fehlen (LaChapelle et al. 1993). Dies führt zu einer Hypersensitivität der erythroiden Vorläuferzellen gegenüber Erythropoetin; Patienten mit PFCP haben in der Regel normale Erythropoetinspiegel im Blut (Kralovics und Prchal 2001). Die bisher bekannten Mutationen, die beim Menschen zu PFCP führen, liegen in Exon 8 des EPOR-Gens und bewirken entweder durch einen Basenaustausch oder durch Deletion einer oder mehrerer Basen die Ausbildung eines neuen Stopp-Codons. Exon 8 codiert für die intrazelluläre Domäne des Epo-Rezeptors, an welcher sich Tyrosinreste befinden. Diese Tyrosinreste sind für die Aktivierung von Molekülen der verschiedenen Signalwege in der Zelle von Bedeutung. Allerdings sind sie auch an der Downregulation der Epo-Rezeptoren beteiligt. Sind nun diese Tyrosinreste aufgrund eines verkürzten Rezeptors nicht oder nur in geringerer Zahl vorhanden, kann es zwar zu einer Aktivierung des Janus-Kinase-STAT Signalwegs, evtl. auch des MAPK/ERK-Signalwegs kommen, die durch Erythropoetin induzierte Downregulation der Epo-Rezeptoren auf erythroiden Vorläuferzellen funktioniert aber nicht mehr (Huang et al. 2010), (Gross et al. 2014). Das führt zu einer vermehrten Bildung von reifen Erythrozyten und zur Ausbildung des Krankheitsbildes der Polyzythämie. Ob beim Schwein allerdings auch SNPs mit ähnlichen Auswirkungen existieren, ist bisher noch nicht geklärt.

Im Erythropoetin-Gen sind bei Mensch und Maus ebenfalls einige SNPs bekannt, jedoch gibt es hier kaum Informationen über deren Funktionen. Nur bei einem SNP in der Promotorregion 1125 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt ist bekannt, dass er mit der Erythropoetinkonzentration korreliert, indem durch das T-Allel eine neue Bindungsstelle für die Proteine EVI1/MEL1 oder AP1 zu Stande kommt (Tong et al. 2008). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Schweine wiesen an dieser Position jedoch keinen SNP auf und zeigten die Base Cytosin.

Für das Schwein war zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit kein SNP bekannt, der mit Parametern des roten Blutbildes korrelierte. Allerdings war im Zusammenhang mit der Ausprägung einer Anämie eine natürliche genetische Resistenz der Rasse Meishan gegenüber dem Parasiten *S. miescheriana* festgestellt worden (Reiner et al. 2002a). In einer QTL-Analyse konnten einige QTL identifiziert werden, welche einen Teil der Varianz im roten Blutbild in einer F2-Kreuzungspopulation bestehend aus den unterschiedlich empfindlichen Rassen Meishan und Pietrain, aufzeigen, nachdem die Tiere mit dem Parasiten infiziert wurden. Ein QTL auf Chromosom 3 in der Nähe des EPO-Gens weist eine signifikante Kopplung mit dem Hämatokrit an Tag 28 p.i. auf. Ein weiterer QTL auf Chromosom 2 nahe des EPOR-Gens erklärt sogar 13,4% der Varianz im roten Blutbild zum Zeitpunkt der chronischen Infektionsphase (Reiner et al. 2007). EPO und EPOR konnten somit auch beim Schwein als Kandidatengene für die Blutbildung bestätigt werden. EPOR gibt sich dabei besonders vielversprechend, wenn es darum geht, die molekulare Basis der Blutbildung und deren rasseabhängige Varianz aufzudecken. Zwar ist beim Schwein das Krankheitsbild der kongenitalen Polyzythämie nicht bekannt, es ist aber durchaus möglich, dass auch hier wie beim Menschen, Mutationen im Erythropoetin-Rezeptor-Gen, insbesondere in Exon 8, auftreten können. Diese Mutationen könnten analog der PFCP Veränderungen in der Ausbildung der Tyrosinreste am Rezeptor bewirken und so auch beim Schwein einen Einfluss auf die Bildung reifer Erythrozyten haben. Auch im EPO-Gen sind SNPs denkbar, die analog des bereits bekannten SNPs beim Menschen in der Promotorregion des Gens liegen und einen Einfluss auf die Genaktivität haben. Sollten im Promotor des Schweins auch Mutationen auftreten, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese ebenfalls einen Einfluss auf die Transkriptionsrate und damit möglicherweise auch Einfluss auf die Erythropoetinkonzentration im Blut haben.

Obwohl in der Zwischenzeit mittels genomweiter Assoziationsstudien bereits einige SNPs mit signifikanter Korrelation mit Parametern des roten Blutbilds detektiert werden konnten (Luo et al. 2012, Wang et al. 2013, Zhang et al. 2013, Jung et al. 2014, Zhang et al. 2014), wurde bis zu den Ergebnissen in dieser Arbeit kein Zusammenhang mit SNPs in den Kandidatengenen EPO oder EPOR detektiert. Auch wurde bisher keine Genvariante identifiziert, welche die varianzbestimmenden QTL auf den Chromosomen 2 und 3 erklären würde. Zwar konnten Zhang et al. auf Chromosom 2 mehrere SNPs mit signifikanter Assoziation zu MCV, MCH bzw. RDW ermitteln, jedoch liegt keiner dieser SNPs in der Nähe von EPOR (2014). Die am nächsten gelegenen Gene stellen SH38BP5L, CPAMD8 und

CARM1 dar (Zhang et al. 2014). Auch auf Chromosom 3 in der Nähe des EPO-Gens wurden bisher keine SNPs mit signifikanten Assoziationen identifiziert. Die meisten der bisher identifizierten SNPs und die SNPs, die in diesen Studien die höchste Signifikanz aufweisen, liegen auf den Chromosomen 7 und 8 (Wattrang et al. 2005, Luo et al. 2012, Zhang et al. 2013, Jung et al. 2014). Wie auch für die hier vorliegende Arbeit wurden in allen dieser Untersuchungen Tiere aus Kreuzungen zwischen europäischen und asiatischen Schweinerassen verwendet. Allerdings ging keiner der anderen Studien ein Infektionsversuch voraus. Durch den Einfluss einer Infektion können aber die Effekte der Merkmalsausprägung verstärkt werden. So konnten in der hier vorliegenden Arbeit durch Einbeziehung der QTL-Analyse nach Infektion mit *S. miescheriana* insgesamt 6 SNPs (EE11, EE11\_2, EE2, EP9\_3, ERE1 und ERE7) identifiziert werden, deren signifikante Korrelation mit dem roten Blutbild unter physiologischen Bedingungen verborgen zu bleiben scheint. Mit Hilfe dieser neu identifizierten SNPs sollte nun die Auswirkung auf die bestehenden QTL näher beleuchtet werden. Die für die QTL-Analyse ausgewählten SNPs wurden einzeln in die bestehende Analyse miteinbezogen und deren Effekte auf den jeweiligen QTL gemessen. Unter Berücksichtigung dieser SNPs zeigen sich für beide QTL positive Effekte, auch unter physiologischen Bedingungen. Besonders deutlich wird der Effekt bei Einbeziehung von ERE7 in den QTL auf Chromosom 2. Es kommt zu einem ausgeprägten Anstieg der F-Werte, insbesondere der Werte für RBC, aber auch für den Hämatokrit und den Hämoglobingehalt. Die Effekte der SNPs in EPO auf den QTL auf Chromosom 3 bleiben allerdings eher gering.

#### **5.4 Variabilität von EPO und EPOR des Schweins im Vergleich mit anderen Tierarten und dem Menschen**

Die große Anzahl an Übereinstimmungen der Basen im EPO-, bzw. EPOR-Gen und die vielen Marker, an deren Position einige Individuen einer Schweinerasse heterozygot sind, ergibt sich durch die Orthologie der Gene und zeigt, dass die Gene EPO und EPOR von Meishan und Pietrian evolutionsgenetisch sehr nahe beieinander liegen. Die Gensequenzen müssen sich in ihrer Urform bereits vor Aufspaltung der beiden Unterarten entwickelt haben. Für die Detektion von merkmalsbestimmenden Genvarianten, insbesondere QTN, ist es von Vorteil, wenn die Elterntiere einen möglichst divergierenden homozygoten Genotyp aufweisen. Diese Tiere liegen in ihrer Merkmalsausprägung weiter auseinander, während deren heterozygote Nachkommen in ihrer Merkmalsausprägung möglichst zwischen den Foundertieren liegen sollten (Falconer und Mackay, 1996). In EPO waren nur bei den SNPs

EE1b, EE11\_2, EP3 und EP3\_1 die Elterntiere homozygot und würden damit einem idealen QTN entsprechen. Obwohl SNP EE2 zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz von Tyrosin zu Phenylalanin führt, entspricht er aufgrund der heterozygoten Elterntiere keinem idealen QTN.

In EPOR liegt der SNP mit der höchsten Signifikanz in Exon 8 (ERE7). Auch er entspricht aufgrund der Genotypen der Elterntiere keinem idealen QTN. Allerdings sind beim Menschen in Exon 8 bereits SNPs bekannt, die zur familiären und kongenitalen Polyzythämie führen, indem sie für einen verkürzten Epo-Rezeptor codieren (LaChapelle et al. 1993). SNP ERE7 hat jedoch im Gegensatz zu den SNPs des Menschen keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge. Es handelt sich um eine stille Mutation, d.h. beide Genvarianten führen zur Produktion der gleichen Aminosäuresequenz. Der SNP hat weder auf die Qualität noch auf die Quantität des Proteins einen Einfluss und führt auch nicht zu einem verkürzten Rezeptor. Es ist nicht davon auszugehen, dass er einen Einfluss auf die Tyrosinreste und damit auch keinen Einfluss auf die Induktion der Signalkaskaden oder die Downregulation der Epo-Rezeptoren hat. Er muss als anonymer Marker angesehen werden, dem keine Funktion zuzuordnen ist.

Trotzdem konnte mit Hilfe der Assoziationsstudie ein signifikanter Einfluss der verschiedenen Genotypen in ERE7 auf die Parameter Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobingehalt und MCHC aufgezeigt werden. Tiere mit dem Genotyp CC an der Position c.1551 zeigen signifikant höhere Werte für die Erythrozytenzahl und den Hämatokrit. Unter Berücksichtigung des Zeitpunkts der chronischen Sarcocystose (Tag 28 p.i und Tag 42 p.i.) sind auch Signifikanzen im Zusammenhang mit dem Hämoglobingehalt zu erkennen.

In einer Studie an einer kommerziellen Population konnte diese Assoziation des SNPs mit Parametern des roten Blutbildes bestätigt werden. Hier waren die Werte für Retikulozytenzahl, Hämatokrit und MCV signifikant erhöht. Besonders deutlich wird die Korrelation mit der Retikulozytenzahl. Tiere mit dem Genotyp CC bilden deutlich mehr Retikulozyten als Tiere mit dem Genotyp TT. Außerdem haben diese Tiere einen signifikant höheren Hämatokrit und signifikant höhere Werte für MCV. Die Werte für RBC und Hämoglobin sind ebenfalls höher, allerdings ist hier keine Signifikanz nachweisbar.

Anhand der hier gewonnenen Ergebnisse scheint es so, als wären Tiere mit dem Genotyp CC schneller in der Lage Erythrozyten nachzubilden und damit dem Entstehen einer Anämie entgegenzuwirken. Es zeigt sich auch, dass die anhand der F2-Generation gewonnenen Ergebnisse mit denen aus der kommerziellen Population übereinstimmen.

### **5.5 Vergleich der Variabilität von EPOR mit bekannten Genvarianten mit Einfluss auf Reproduktionsparameter beim Schwein**

Das Erythropoetin-Rezeptor Gen stellt beim Schwein nicht nur für die Blutbildung ein Kandidatengen dar. Es ist gleichzeitig auch ein Kandidatengen für Parameter der Reproduktion wie der Wurfgröße (ZHANG et al. 2011b; ZHANG et al. 2011a) oder der Uterusgröße des Schweins, welche durch die Erythropoese der Feten beeinflusst wird (Vallet et al. 2005). Ein Teil der von Vallet et al. und Zhang et al. gefundenen Marker konnte in der hier durchgeführten Kandidatengenanalyse ebenfalls detektiert werden und es zeigen sich Zusammenhänge mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parametern des roten Blutbilds. Der 2005 von Vallet et al. identifizierte SNP g.2373C>T (Gen-Bank Ass. No. EU407778) (entspricht ERE5) in Intron 4 konnte bestätigt werden. Die untersuchten Meishan tragen an dieser Position entweder den Genotyp CC oder CT, während Pietrain alle den Genotyp TT tragen. Das T-Allel bewirkt die Ausbildung einer neuen Bindungsstelle für GATA-1 (Vallet et al. 2005), welches transkriptionsregulierend wirken kann. Die Anwesenheit des T-Allels korrelierte in der Studie von Vallet et al. (2005) mit einer höheren Uteruskapazität der Sauen. Das Vorhandensein des T-Allels in den Feten zeigte eine positive Korrelation mit der Wurfstärke. Allerdings konnten diese Ergebnisse in einer weiteren Studie von Zhang et al. nicht bestätigt werden. Hier zeigte der SNP keinen Zusammenhang mit der Wurfgröße (ZHANG et al. 2011b). Der Einfluss von ERE 5 auf das rote Blutbild erwies sich in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls als sehr gering. Lediglich im Zusammenhang mit der Erythrozythenzahl zeigte der SNP in der F2-Generation an Tag 28 p.i. eine Signifikanz bezüglich der Erhöhung der Werte des Genotyps CC. Zu den anderen Zeitpunkten und im Zusammenhang mit MCHC, Hkt, und Hb ist ebenfalls eine Tendenz zu höheren Werten des Genotyps CC erkennbar, welche sich jedoch als nicht signifikant erwies (siehe Kap.4.5).

Die Untersuchungen von Zhang et al. detektierten insgesamt 8 weitere SNPs in EPOR. Der SNP c.1551C>T (entspricht ERE7) (GenBank Ass. No. NM\_214292.1) wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls detektiert. Die untersuchten Meishan-Sauen tragen den Genotyp CC bzw. CT, die Pietrain-Eber den Genotyp TT. Der SNP zeigte in der Studie von Zhang et al. (2011b) weder eine Korrelation mit der Gesamtzahl an geborenen Ferkeln noch mit der Anzahl lebend geborener Ferkel. Er scheint keinen Einfluss auf die Wurfgröße zu haben. Signifikante Zusammenhänge konnten aber in der hier durchgeführten Arbeit mit den Parametern des roten Blutbildes gefunden werden. (siehe Kap. 4.5)

Die anderen sieben bisher identifizierten SNPs konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. An der Position g.705 zeigten die Untersuchungen von Zhang et al. (2011b) einen

Basenaustausch von Guanin zu Thymin, der mit der Wurfgröße in Verbindung steht. Thymin bewirkt eine geringere Wurfstärke als Guanin. Guanin soll im Gegensatz zu den europäischen Schweinerassen vermehrt bei chinesischen Rassen auftreten. Die hier untersuchten Meishan und Pietrain der F0-Generation tragen allerdings alle die Base Thymin, so dass die Position nicht als SNP identifiziert wurde.

Ein von Zhang et al. (2011a) in Exon 3 lokalisierter Marker, c.434G>A (Gen Bank Ass. No. NM\_214292.1) führt zu einem Austausch von Adenin zu Guanin. Die Base Guanin korreliert mit einer größeren Anzahl von Ferkeln im Wurf und wurde vermehrt bei den asiatischen Schweinerassen gefunden (ZHANG et al. 2011a). Auch hier tragen alle untersuchten Elterntiere an dieser Position die Base Guanin und somit auch das Allel für die höheren Ferkelzahlen. Für Untersuchungen bezüglich der Korrelation mit Parametern des roten Blutbildes konnte der Marker aufgrund der fehlenden Segregation der verwendeten Ausgangstiere nicht verwendet werden. Insgesamt drängt sich bei diesen Untersuchungen die Frage auf, ob die Assoziationen zwischen den aufgezeigten SNPs und der Fruchtbarkeitsleistung direkter Natur sind, oder ob sie sich als Assoziation zum chinesischen Genanteil, der seinerseits mit einer höheren Fruchtbarkeit einhergeht, indirekt ergeben.

## 5.6 Methodik

Die Infektion mit dem Erreger *S. miescheriana* führt zur Ausbildung einer akuten als auch einer chronischen Krankheitsphase. Außerdem wird die Blutbildung indirekt über Blutverluste tangiert. Der Erreger eignet sich daher sehr gut als Modell akuter und chronischer Anämieformen. Aus diesem Grund wurde er für die hier vorliegende Arbeit ausgewählt. Sie knüpft an eine anhand einer F2-Kreuzungsfamilie von Meishan und Pietrain durchgeführte QTL-Analyse an. Die QTL-Analyse stellt eine gängige und bewährte Methode dar, um merkmalsbestimmende Kandidatengene zunächst grob zu lokalisieren. Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Durchführung von QTL-Analysen ist die Verfügbarkeit informativer Marker. Für die vorliegende Untersuchung wurden hierfür Mikrosatelliten verwendet. Die Vorgehensweise ergab sich aus der Verwendung des bereits Anfang 2000 genotypisierten Tierkollektivs.

In der Zwischenzeit erfolgt die Genotypisierung meist auf der Basis von Whole Genome Analysen mit Hilfe von SNP-Chips oder Next Generation Sequencing (Jung et al. 2013, Zhang et al. 2014). Beide Verfahren ermöglichen eine schnellere Abarbeitung mit erheblich dichterem Markerabdeckung. Aktuell existiert ein kommerziell erhältlicher SNPChip für das

Schwein, welcher die Durchführung genomweiter Assoziationsstudien ermöglicht (Ramis et al. 2009, Fan et al. 2011). Anhand bereits bekannter SNPs wird die Assoziation zu den entsprechenden Phänotypen ermittelt.

Ausgehend von den gewonnenen Ergebnissen der QTL-Analyse, bzw. der GWAS kann daraufhin eine Feinkartierung, z.B. durch eine Kandidatengenanalyse, folgen, welche in der hier vorliegenden Arbeit für die Kandidatengene EPO und EPOR umgesetzt wurde.

### **5.7 Folgen aus den gewonnenen Ergebnissen**

In EPO und dessen Promotorregion wurden zahlreiche Marker gefunden, die jedoch zumeist durch die Heterozygotie der Allele keine ideale Verteilung der Genotypen aufweisen. Aufgrund der großen Menge an gefunden SNPs wurden in die weiteren Untersuchungen nur bestimmte SNPs einbezogen, die mit größerer Wahrscheinlichkeit einen Effekt haben konnten. Außerdem wurden stichprobenweiße Marker in der Promotorregion untersucht, um bei einer gekoppelten Vererbung Auswirkung auf den bestehenden QTL zu identifizieren.

Insgesamt wurde nur eine begrenzte Auswahl an Markern in der Promotorregion in QTL-Analysen oder Assoziationsstudien geprüft. Anhand der untersuchten SNPs konnte zwar ein Einfluss auf den QTL auf Chromosom 3 nachgewiesen werden, ein QTN wurde aber nicht identifiziert. Auch ist die Auswirkung der untersuchten SNPs in EPO auf den QTL im Vergleich zu ERE 7 in EPOR eher gering, so dass eine direkte Kopplung mit dem QTN eher unwahrscheinlich ist. Desweiteren konnte die Segregation der Allele für die SNPs in EPO zwar auch in der kommerziellen Population dargestellt werden; die bei den Meishan vorherrschenden Genotypen treten jedoch selten auf. Weitere Untersuchungen sind nötig, um alle detektierten SNPs auf ihre Effekte zu prüfen und eine abschließende Aussage über das Vorhandensein eines QTN in EPO machen zu können.

Die Untersuchungen des EPOR-Gens konnten ebenfalls den merkmalsbestimmenden QTN nicht identifizieren. Zwar wurde mit ERE7 ein Marker gefunden, der anhand der gewonnenen Ergebnisse der gesuchte QTN sein könnte, jedoch befindet sich in der Kurve der F-Werte der QTL für die F2-Generation genau über dem SNP ein Einbruch an den Tagen 0, 28 und 42 p.i. Der höchste F-Wert liegt damit nicht direkt über dem SNP. Erklärbar wäre dieser Sachverhalt dadurch, dass ERE7 mit dem eigentlichen QTN gekoppelt vererbt wird, allerdings müssen auch hier weitere Untersuchungen abschließend klären, welches nun der tatsächlich gesuchte QTN ist. Allem voran sind weitere Untersuchungen des Promotors durchzuführen, die aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit der Sequenzen in den Datenbanken, in dieser Arbeit

---

nur zum Teil realisiert werden konnten. Mit großer Wahrscheinlichkeit liegt der gesuchte QTN weiter in 5'-Richtung der für die hier vorliegende Arbeit eingesetzten Gensequenz.

Ziel dieser Arbeit war es einen Genmarker zu identifizieren, der positive Effekte auf die Blutbildung und damit auf die Krankheitsresistenz des Schweins im Bezug auf Anämien hat und gleichzeitig tierzüchterisch genutzt werden kann. Mit ERE7 konnte ein Marker identifiziert werden, der einen solchen Effekt auf die Blutbildung besitzt. Da der Marker in kommerziellen Populationen bereits vorhanden ist, wäre eine tierzüchterische Nutzung nicht ausgeschlossen. Allerdings bleibt zu bedenken, dass über weitere evtl. vorhandene Kopplungseffekte bisher nichts bekannt ist. Zwar konnte für den SNP ERE7 selbst bisher noch keine Assoziation mit Fruchtbarkeitsparametern nachgewiesen werden, allerdings liegen in seiner unmittelbaren Nähe im EPOR-Gen SNPs, die solche Effekte aufweisen (Zhang et al. 2011b). Die Kopplungseffekte mit diesen SNPs und der Einfluss auf weitere phänotypische Merkmale sollte erst geklärt werden, bevor eine Selektion der Elterntiere auf diesen Marker erfolgt, da sonst die Gefahr besteht, ungewollt auf unerwünschte Merkmale zu selektieren.

## 6 Zusammenfassung

Anämien stellen bei Hausschweinen häufig vorkommende Krankheitssymptome dar. Dabei scheint es rassotypische Unterschiede in der Ausprägung der Anämien zu geben. Allerdings ist über die molekulargenetische Komponente in der Ausbildung noch recht wenig bekannt. Diskutiert werden molekulare Veränderungen in dem bei der Erythrozytenbildung beteiligten Protein Erythropoetin oder dem auf den erythroiden Vorläuferzellen vorkommenden Erythropoetin-Rezeptor. Beim Menschen sind Mutationen bekannt, die zu einer Änderung des Rezeptors, bzw. den an der Signalkaskade beteiligten Proteinen führen, und damit die Ausbildung von Anämien induzieren. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, genetische Unterschiede in den Genen EPO und EPOR zu detektieren, die mit Varianzen in der Ausprägung des roten Blutbildes beim Schwein assoziiert sind.

Anhand einer gut charakterisierten Pietrain-Meishan-Kreuzungspopulation wurden die Gene EPO und EPOR auf ihre genetische Variabilität hin untersucht. Ziel war es, das für die QTL verantwortliche Nukleotid (QTN) auf den Chromosomen 2 und 3 zu detektieren. Mittels vergleichender Sequenzanalyse konnten in EPO und dessen Promotorregion insgesamt 21 SNPs und in EPOR insgesamt 4 SNPs identifiziert werden. Um die 139 F<sub>2</sub>-Tiere der Pietrain-Meishan-Kreuzungspopulation auf ihre Genotypen hinsichtlich der neu identifizierten SNPs zu charakterisieren, wurde das Verfahren der Pyrosequenzierung angewendet. Anhand der ermittelten Genotypen der Parenteralgeneration und der Lage der SNPs in der Gensequenz wurden insgesamt 7 der 21 SNPs in EPO in die nachfolgende QTL-Analyse einbezogen. Da die F<sub>2</sub>-Population bei zwei der vier SNPs in EPOR eine Ungleichverteilung der Genotypen aufwies, wurden diese SNPs in der darauffolgenden QTL-Analyse nicht weiter berücksichtigt. Unter Einbeziehung der neu entwickelten SNPs zeigten sich für die bekannten QTL auf den Chromosomen 2 und 3 positive Effekte. Während der Einfluss auf den QTL auf Chromosom 2 vergleichsweise eher gering war, zeigte sich jedoch für den QTL auf Chromosom 3 eine signifikante Assoziation unter Einbeziehung des SNPs ERE7. Tiere mit dem Meishangenotyp (CC) hatten signifikant höhere Werte für verschiedene Parameter des roten Blutbilds.

In einer kommerziellen Population von 90 Hybridsauen (Jungsauen DLxDE) konnte die Assoziation zwischen dem Genotyp CC von ERE7 und den Parametern RBC, Hämatokrit und Hämoglobin ebenfalls hergestellt werden. Auch hier zeigten Tiere mit dem Genotyp CC signifikant höhere Werte. Am deutlichsten wurde dieser Zusammenhang bei der Retikulozytenzahl. Es scheint, als wären die Tiere mit dem Genotyp CC schneller und effizienter in der Lage Erythrozyten nachzubilden. Allerdings war der SNP nicht mit einem

---

Aminosäurenaustausch verknüpft; daher ist ERE7 mit großer Wahrscheinlichkeit nicht der gesuchte QTN sondern wird mit diesem nur gekoppelt vererbt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde kein weiterer SNP entdeckt, welcher den gesuchten QTN darstellen könnte. Es ist denkbar, dass der gesuchte QTN im Promotor des EPOR-Gens liegt, da hier elementare Steuerungselemente für die Transkriptionsaktivität liegen. Aufgrund der zum Zeitpunkt der Anfertigung der Arbeit nur zum Teil bekannten Sequenzen des Promotors von EPOR, konnte die Untersuchung des Promotors allerdings nur in geringem Umfang realisiert werden.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit untermauern dennoch die Hypothese, dass EPOR ein Kandidatengens für die Variabilität in der Ausprägung des roten Blutbilds beim Schwein darstellt. Außerdem unterstreichen sie die Annahme, dass im EPOR-Gen des Schweins wie auch beim Menschen Mutationen auftreten können, die die Bildung reifer Erythrozyten beeinflussen. Die Arbeit zeigt, dass die genetische Variabilität auch in der Hybridpopulation vorhanden ist und somit genetisch unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Anämien bei Mastschweinen bestehen. In weiteren Untersuchungen sollte nun abschließend geklärt werden, wo der eigentlich gesuchte QTN im EPOR-Gen liegt und welche weiteren Kopplungseffekte mit ERE7 zu erwarten sind. Dann wäre auch eine tierzüchterische Nutzung dieses SNPs im Hinblick auf die Krankheitsresistenz beim Schwein denkbar.

## 7 Summary

Forms of anemia occur frequently in domestic pigs and differences in the manifestation of anemia seem to be existent in different pig breeds. The molecular components of such differences, however, remain unknown. Molecular variation in erythropoietin and the erythropoietin receptor which are involved in the process of erythropoiesis might be candidates for genetic differences between populations and breeds. Mutations inducing anemia because of conformational or regulatory changes of the proteins or the signaling pathways are well known in humans. The aim of the present study was to detect genetic variation in candidate genes EPO and EPOR associated with differences in erythropoiesis in swine.

EPO and EPOR were sequenced in a well described Pietrain-Meishan-F2-Family. Both genes were screened for SNPs that could be associated with the effects of two QTL for erythroid traits that had been mapped to porcine chromosomes (SSC) 2 and 3. Twenty one and 4 SNPs were detected in EPO and EPOR, respectively. Based on amino acid substitution, homozygosity and differences between founder breeds, a set of the 7 most promising SNPs was chosen for a screening of the 139 F2-pigs by pyrosequencing.

While the influence on the QTL on chromosome 3 was comparatively low, the QTL on SSC2 was significantly affected by SNP ERE7. Pigs homozygous for the Meishan-allele (C) showed more effective erythrocyte phenotypes. This association could be verified in a commercial cohort of 90 hybrid-sows (gilt German Landrace x German Edelschwein). However, this SNP was not associated with amino acid substitution. Thus, it seems to be linked with, but not the QTN responsible for the genetic variability of erythroid parameters in this population. SNPs in the promoter of EPOR could not be comprehensively analysed, because the sequences of EPO and EPOR were not available from public resources at the time of this investigation and a BAC with the complete sequence could not be isolated from the screened BAC bank.

Further studies are needed to identify the QTN that could help to screen for pigs with a desirably high efficiency in erythropoiesis that could help stabilizing pigs' adaptational potential to diseases in the future.

## 8 Literaturverzeichnis

Abramson, S. (1977): The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. In: *Journal of Experimental Medicine* 145 (6), S. 1567–1579.

Aplan, P. D.; Nakahara, K.; Orkin, S. H.; Kirsch, I. R. (1992): The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. In: *EMBO J.* 11 (11), S. 4073–4081.

Arany, Z.; Huang, L. E.; Eckner, R.; Bhattacharya, S.; Jiang, C.; Goldberg, M. A. et al. (1996): An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (23), S. 12969–12973.

Aurich, Christine; Engelhardt, Wolfgang von (2010): *Physiologie der Haustiere*. 3. Aufl. Stuttgart: Enke.

Bachmann, S.; Le, HirM; Eckardt, K. U. (1993): Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. In: *J Histochem Cytochem* 41 (3), S. 335–341.

Bao, H.; Jacobs-Helber, S. M.; Lawson, A. E.; Penta, K.; Wickrema, A.; Sawyer, S. T. (1999): Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). In: *Blood* 93 (11), S. 3757–3773.

Barrows, P. L.; Prestwood, A. K.; Green, C. E. (1982): Experimental *Sarcocystis suicanis* infections: disease in growing pigs. In: *Am. J. Vet. Res* 43 (8), S. 1409–1412.

Bazan, J. F. (1989): A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 164 (2), S. 788–795.

Beck, I.; Ramirez, S.; Weinmann, R.; Caro, J. (1991): Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. In: *J. Biol. Chem* 266 (24), S. 15563–15566.

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

**Berge, Thomas (2008):** Genomweite Kartierung von QTL mit Assoziation zur Resistenz, Empfindlichkeit gegenüber *Sarcocystis miescheriana* beim Schwein. 1. Aufl. Giessen VVB Laufersweiler

**Blanchard, K. L.; Acquaviva, A. M.; Galson, D. L.; Bunn, H. F. (1992):** Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. In: *Mol. Cell. Biol* 12 (12), S. 5373–5385.

**Blome, Sandra (2006):** Zur Pathogenese der Klassischen Schweinepest: Analysen der Blutgerinnungsstörungen.

**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: *Anim. Genet* 42 (4), S. 386–394.

**Brown, Terry A.; Jarosch, Birgit (2007):** Genome und Gene. Lehrbuch der molekularen Genetik. 3. Aufl. [der Orig.-Ausg.] = 1. Aufl. [der dt. Ausg.]. Berlin: Spektrum Akad.

**Butel, Janet S.; Vilchez, Regis A.; Jorgensen, Jeffrey L.; Kozinetz, Claudia A. (2003):** Association between SV40 and non-Hodgkin's lymphoma. In: *Leuk. Lymphoma* 44 Suppl 3, S. S33-9.

**Cameron, H. S.; Hughes, E. H.; Gregory, P. W. (1942):** Genetic resistance to brucellosis in swine. In: *J. Anim. Sci* (1), S. 106–110.

**Charoensook, Rangsun; Gatphayak, Kesinee; Sharifi, Ahmad Reza; Chaisongkram, Chavin; Brenig, Bertram; Knorr, Christoph (2012):** Polymorphisms in the bovine HSP90AB1 gene are associated with heat tolerance in Thai indigenous cattle. In: *Trop Anim Health Prod* 44 (4), S. 921–928.

**Chateauvieux, S.; Grigorakaki, C.; Morceau, F.; Dicato, M.; Diederich, M. (2011):** Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. In: *Biochem. Pharmacol* 82 (10), S. 1291–1303.

**Cheung, J. Y.; Miller, B. A. (2001):** Molecular mechanisms of erythropoietin signaling. In: *Nephron* 87 (3), S. 215–222.

**Chin, K.; Oda, N.; Shen, K.; Noguchi, C. T. (1995):** Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs. In: *Nucleic Acids Res* 23 (15), S. 3041–3049.

Cho, I. C.; Park, H. B.; Yoo, C. K.; Lee, G. J.; Lim, H. T.; Lee, J. B. et al. (2011a): QTL analysis of white blood cell, platelet and red blood cell-related traits in an F2 intercross between Landrace and Korean native pigs. In: *Anim. Genet* 42 (6), S. 621–626.

Cho, In-Cheol; Zhong, Tao; Seo, Bo-Young; Jung, Eun-Ji; Yoo, Chae-Kyoung; Kim, Jae-Hwan et al. (2011b): Whole-genome association study for the roan coat color in an intercrossed pig population between Landrace and Korean native pig. In: *Genes Genom* 33 (1), S. 17–23.

Claveria, F. G.; La Peña, C. de; Cruz-Flores, M. J. (2001): Sarcocystis miescheriana infection in domestic pigs (*Sus scrofa*) in the Philippines. In: *J. Parasitol* 87 (4), S. 938–939.

Clemens, Nina Maria (2010): Untersuchungen zur GOT1 als Kandidatengen für die Variabilität der Serum-Aspartat-Aminotransferase-Spiegel beim Schwein. 1. Aufl. Giessen: VVB Laufersweiler.

Dame, C. (2003): Hepatic Erythropoietin Gene Regulation by GATA-4. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (4), S. 2955–2961.

Dame, C.; Fahnenstich, H.; Freitag, P.; Hofmann, D.; Abdul-Nour, T.; Bartmann, P.; Fandrey, J. (1998): Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. In: *Blood* 92 (9), S. 3218–3225.

Damen, J. E.; Cutler, R. L.; Jiao, H.; Yi, T.; Krystal, G. (1995): Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. In: *J. Biol. Chem* 270 (40), S. 23402–23408.

Damriyasa, I. M.; Bauer, C.; Edelhofer, R.; Failing, K.; Lind, P.; Petersen, E. et al. (2004): Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. In: *Vet. Parasitol* 126 (3), S. 271–286.

Dauguschies, A.; Altfeld, E.; Rommel, M. (1989a): Hemostatic alterations in pigs fed sublethal doses of *Sarcocystis miescheriana*. In: *Vet. Parasitol* 34 (1-2), S. 1–13.

Dauguschies, A.; Rommel, M.; Hoppen, H. O. (1989b): Prostanoids during acute sarcocystiosis in growing pigs. In: *Parasitol. Res* 76 (2), S. 115–118.

David, R. B.; Blom, A. K.; Sjaastad, O. V.; Harbitz, I. (2001): The porcine erythropoietin gene: cDNA sequence, genomic sequence and expression analyses in piglets. In: *Domest. Anim. Endocrinol* 20 (2), S. 137–147.

David, R. B.; Sjaastad, O. V.; Blom, A. K.; Skogtvedt, S.; Opsata, M.; Harbitz, I. (2002): Ontogeny of erythropoietin mRNA expression in liver, kidneys and testes of the foetal and the neonatal pig. In: *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol* 131 (3), S. 527–533.

Demarmels Biasiutti, Franziska (2010): Die Begleitanämie oder Anämie bei chronischen Erkrankungen - Pathogenese, Klinik und Therapie. In: *Ther Umsch* 67 (5), S. 225–228.

Deplazes, Peter; Eckert, Johannes; Samson-Himmelstjerna, Georg; Zahner, Horst (2013): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 3. Aufl. Stuttgart: Enke.

Diamandopoulos, G. T. (1972): Leukemia, lymphoma, and osteosarcoma induced in the Syrian golden hamster by simian virus 40. In: *Science* 176 (4031), S. 173–175.

Dubey, J. P.; Powell, E. C. (1994): Prevalence of Sarcocystis in sows from Iowa. In: *Vet. Parasitol* 52 (1-2), S. 151–155.

Dynan, W. S.; Tjian, R. (1983): The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. In: *Cell* 35 (1), S. 79–87.

Dynan, William S.; Tjian, Robert (1985): Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. In: *Nature* 316 (6031), S. 774–778.

Eckardt, K. U. (1996): Erythropoietin production in liver and kidneys. In: *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 5 (1), S. 28–34.

Erber, M.; Geisel, O. (1979): Untersuchungen zur Klinik und Pathologie der Sarcocystis-suicanis-Infektion beim Schwein. In: *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr* 92 (10), S. 197–202.

Evans, T.; Felsenfeld, G. (1989): The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. In: *Cell* 58 (5), S. 877–885.

Evans, T.; Reitman, M.; Felsenfeld, G. (1988): An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85 (16), S. 5976–5980.

---

Fahrenkrug, S. C.; Campbell, E. M.; Vallet, J. L.; Rohrer, G. A. (2000): Physical assignment of the porcine erythropoietin receptor gene to SSC2. In: *Animal Genetics* 31 (1), S. 69–70.

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

Fan, B.; Gorbach, D.M; Rothschild, M.F (2011): The Pig Genome Project Has Plenty to Squeal about. In: *Cytogenet Genome Res* 134 (1), S. 9–18.

Fandrey, J.; Bunn, H. F. (1993): In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction, In: *Blood* 81 (3), S. 617-623.

Fandrey, J. (2004a): *Wie reagiert unser Körper auf Sauerstoffmangel?:* Schöningh. Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=IM7ebTp5vBoC>.

Fandrey, Joachim (2004b): Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. In: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286 (6), S. R977-88.

Ferrando, A. A. (2004): Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood* 103 (5), S. 1909–1911.

Frey, J.; Bosse, J. T.; Chang, Y.-F; Cullen, J. M.; Fenwick, B.; Gerlach, G. F. et al. (1993): Actinobacillus pleuropneumoniae RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. In: *Journal of General Microbiology* 139 (8), S. 1723–1728.

FUGATO - Funktionelle Genomanalyse im Tierischen Organismus (2011): FUGATO-plus: Projektvorstellung. Online verfügbar unter [http://www.fugato-forschung.de/fugatoplus\\_projektvorstellung.html](http://www.fugato-forschung.de/fugatoplus_projektvorstellung.html)

Furmanski, Kazimierz (1987): *Häufigkeit von Infektionen mit Sarcocystis miescheriana und Sarcocystis suis hominis bei Schlachtschweinen in bezug auf verschiedene Betriebssysteme* /: [s.n.] (Inaugural-Dissertation / Tierärztliche Hochschule Hannover).

Galson, D. L.; Tan, C. C.; Ratcliffe, P. J.; Bunn, H. F. (1993): Comparison of the human and mouse erythropoietin genes shows extensive homology in the flanking regions. In: *Blood* 82 (11), S. 3321–3326.

Galson, D. L.; Tsuchiya, T.; Tendler, D. S.; Huang, L. E.; Ren, Y.; Ogura, T.; Bunn, H. F. (1995): The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. In: *Mol Cell Biol* 15 (4), S. 2135–2144.

Garst, Andrew D.; Batey, Robert T. (2009): A switch in time: Detailing the life of a riboswitch. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1789 (9-10), S. 584–591.

Geldermann, H. (1975): Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. In: *Theoret. Appl. Genetics* 46 (7), S. 319–330.

Giardi A. J., Sweet B. H. Slotnick V. B. Hilleman M. R. (1962): Developmnet of tumors in hamsters inoculated in the neonatal period with vacoullating virus SV40. In: *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 109 (3), S. 649–660.

Gibbs, A. R.; Jasani, B.; Pepper, C.; Navabi, H.; Wynford-Thomas, D. (1998): SV40 DNA sequences in mesotheliomas. In: *Dev. Biol. Stand.* 94, S. 41–45.

Gong, Yuan-Fang; Lu, Xin; Wang, Zhi-Peng; Hu, Fang; Luo, Yan-Ru; Cai, Shao-Qian et al. (2010): Detection of quantitative trait loci affecting haematological traits in swine via genome scanning. In: *BMC Genet* 11 (1), S. 56.

Goodwin, R. (1990): Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: Demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. In: *Cell* 60 (6), S. 941–951.

Gregory, C. J. (1976): Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: Studies of three erythropoietic colony responses in culture. In: *J. Cell. Physiol* 89 (2), S. 289–301.

Gregory, C. J.; Eaves, A. C. (1977): Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. In: *Blood* 49 (6), S. 855–864.

Gross, Mor; Ben-Califa, Nathalie; McMullin, Mary F.; Percy, Melanie J.; Bento, Celeste; Cario, Holger et al. (2014): Polycythaemia-inducing mutations in the erythropoietin receptor (EPOR): mechanism and function as elucidated by epidermal growth factor receptor-EPOR chimeras. In: *Br. J. Haematol.* 165 (4), S. 519–528.

Guidi, Gian Cesare; Lechi Santonastaso, Clara (2010): Advancements in anemias related to chronic conditions. In: *Clin. Chem. Lab. Med.* 48 (9), S. 1217–1226.

Haase, Bianca; Obexer-Ruff, Gabriela; Dolf, Gaudenz; Rieder, Stefan; Burger, Dominik; Poncet, Pierre-André et al. (2010): Haematological parameters are normal in dominant white Franches-Montagnes horses carrying a KIT mutation. In: *Vet. J.* 184 (3), S. 315–317.

Haase, Volker H. (2013): Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. In: *Blood Rev.* 27 (1), S. 41–53.

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: *Journal of Animal Breeding and Genetics* 115 (1-6), S. 181–189.

Haley, C. S.; Knott, S. A.; Elsen, J. M. (1994): Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. In: *Genetics* 136, S. 1195-1207.

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: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100 (13), S. 7443–7448.

Hattangadi, S. M.; Wong, P.; Zhang, L.; Flygare, J.; Lodish, H. F. (2011): From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. In: *Blood* 118 (24), S. 6258–6268.

Heinsohn, Susanne; Szendroi, Miklos; Bielack, Stefan; Zur Stadt, Udo; Kabisch, Hartmut (2009): Evaluation of SV40 in osteosarcoma and healthy population: a Hungarian-German study. In: *Oncol. Rep.* 21 (2), S. 289–297.

Hepp, Sabine (2006): Phänotypische und genetische Parameter ausgewählter klinischer und klinisch-chemischer Merkmale zur Charakterisierung der Resistenz gegenüber *Sarcocystis miescheriana* im F 2 -Modell beim Schwein. 1. Aufl. Wettenberg: VVB Laufersweiler.

Huang, Lily J.; Shen, Yu-Min; Bulut, Gamze B. (2010): Advances in understanding the pathogenesis of primary familial and congenital polycythaemia. In: *British Journal of Haematology* 148 (6), S. 844–852.

Huddleston, H. (2003): Functional p85 gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. In: *Blood* 102 (1), S. 142–145.

---

Hutt, F. B. (1958): Genetic resistance to disease in domestic animals. Ithaka: Comstock Publishing Associates.

Imagawa, S.; Yamamoto, M.; Miura, Y. (1997): Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. In: *Blood* 89 (4), S. 1430–1439.

Imagawa, Shigehiko; Nakano, Yoko; Obara, Naoshi; Suzuki, Norio; Doi, Takeshi; Kodama, Tatsuhiko et al. (2003): A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1beta, TNF-alpha, or L-NMMA. In: *FASEB J* 17 (12), S. 1742–1744.

Jackson, I. J. (1994): Molecular and developmental genetics of mouse coat color. In: *Annu. Rev. Genet.* 28, S. 189–217.

Jelkmann, Wolfgang (2011): Regulation of erythropoietin production. In: *J. Physiol. (Lond.)* 589 (Pt 6), S. 1251–1258.

Jiang, Chenglan; Xing, Feng; Xing, Jinyi; Jiang, Yunliang; Zhou, Enmin (2012): Different expression patterns of PRRSV mediator genes in the lung tissues of PRRSV resistant and susceptible pigs. In: *Developmental and comparative immunology*.

Johannes, Frank; Blizard, David A.; Lionikas, Arimantas; Lang, Dena H.; Vandenberg, David J.; Stout, Joseph T. et al. (2006): QTL influencing baseline hematocrit in the C57BL/6J and DBA/2J lineage: age-related effects. In: *Mamm. Genome* 17 (6), S. 689–699.

Johansson, A.; Pielberg, G.; Andersson, L.; Edfors-Lilja, I. (2005): Polymorphism at the porcine Dominant white/KIT locus influence coat colour and peripheral blood cell measures. In: *Anim. Genet.* 36 (4), S. 288–296.

Johnson, J. C.; Stewart, T. B.; Hale, O. M. (1975): Differential responses of Duroc, Hampshire, and crossbred pigs to a superimposed experimental infection with the intestinal threadworm, *Strongyloides ransomi*. In: *J. Parasitol.* 61 (3), S. 517–524.

Jones, S. S.; D'Andrea, A. D.; Haines, L. L.; Wong, G. G. (1990): Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. In: *Blood* 76 (1), S. 31–35.

Jung, E. J.; Park, H. B.; Lee, J. B.; Yoo, C. K.; Kim, H. I.; Cho, I. C.; Lim, H. T. (2014): Genome-wide association study identifies quantitative trait loci affecting hematological traits in an F2 intercross between Landrace and Korean native pigs. In: *Anim. Genet.* 45, S. 534–541

- Juul, S. E.,; McPherson, R. J.; Farrell, F.X.; Jolliffe, L.; Ness, D. J.; Gleason, C. A. (2004): Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin. In: *Biol Neonate*, 85, S. 138–144
- Kapitsinou, P. P.; Liu, Q.; Unger, T. L.; Rha, J.; Davidoff, O.; Keith, B. et al. (2010): Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. In: *Blood* 116 (16), S. 3039–3048.
- Katz, Odelia; Gil, Lidor; Lifshitz, Lilach; Prutchi-Sagiv, Sara; Gassmann, Max; Mittelman, Moshe; Neumann, Drorit (2007): Erythropoietin enhances immune responses in mice. In: *Eur. J. Immunol.* 37 (6), S. 1584–1593.
- Kazuo, Todokoro; Satomi, Kuramochi; Toshiro, Nagasawa; Tsukasa, Abe; Yoji, Ikawa (1991): Isolation of a cDNA encoding a potential soluble receptor for human erythropoietin. In: *Gene* 106 (2), S. 283–284.
- Kia, Eshrat Beigom; Mirhendi, Hossein; Rezaeian, Mostafa; Zahabiun, Farzaneh; Sharbatkhori, Mitra (2011): First molecular identification of *Sarcocystis miescheriana* (Protozoa, Apicomplexa) from wild boar (*Sus scrofa*) in Iran. In: *Exp. Parasitol* 127 (3), S. 724–726.
- Kixmüller, Marioon (2004): Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie. Vet. med. Diss. München.
- Klingmüller, U.; Wu, H.; Hsiao, J. G.; Toker, A.; Duckworth, B. C.; Cantley, L. C.; Lodish, H. F. (1997): Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94 (7), S. 3016–3021.
- Ko, L. J.; Engel, J. D. (1993): DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. In: *Mol. Cell. Biol.* 13 (7), S. 4011–4022.
- Kraft, Wilfried; Dürr, Ulrich M. (2013): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 7. Aufl. Stuttgart: Schattauer.
- Kralovics, Robert; Prchal, Josef T. (2001): Genetic heterogeneity of primary familial and congenital polycythemia. In: *Am. J. Hematol.* 68 (2), S. 115–121.

Kuramochi, S.; Ikawa, Y.; Todokoro, K. (1990): Characterization of murine erythropoietin receptor genes. In: *J. Mol. Biol* 216 (3), S. 567–575.

LaChapelle, Albert; Traskelin, Ann-Liz; Juvonen, Eeva (1993): Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. In: *Genetics* (90), S. 4495–4499

La Ferla, Katia; Reimann, Christian; Jelkmann, Wolfgang; Hellwig-Bürgel, Thomas (2002): Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. In: *FASEB J.* 16 (13), S. 1811–1813.

Lee, Pauline; Peng, Hongfan; Gelbart, Terri; Wang, Lei; Beutler, Ernest (2005): Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (6), S. 1906–1910.

Lifshitz, Lilach; Prutchi-Sagiv, Sara; Avneon, Maayan; Gassmann, Max; Mittelman, Moshe; Neumann, Drorit (2009): Non-erythroid activities of erythropoietin: Functional effects on murine dendritic cells. In: *Mol. Immunol.* 46 (4), S. 713–721.

Lin, F. K.; Lin, C. H.; Lai, P. H.; Browne, J. K.; Egrie, J. C.; Smalling, R. et al. (1986): Monkey erythropoietin gene: cloning, expression and comparison with the human erythropoietin gene. In: *Gene* 44 (2-3), S. 201–209.

Listowski, Marcin A.; Heger, Elżbieta; Bogusławska, Dżamila M.; Machnicka, Beata; Kulickowski, Kazimierz; Leluk, Jacek; Sikorski, Aleksander F. (2013): microRNAs: fine tuning of erythropoiesis. In: *Cell. Mol. Biol. Lett.* 18 (1), S. 34–46.

Liu, Qingdu; Davidoff, Olena; Niss, Knut; Haase, Volker H. (2012): Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. In: *J. Clin. Invest.* 122 (12), S. 4635–4644.

Liu, W. S.; Harbitz, I.; Gustavsson, I.; Chowdhary, B. P. (1998): Mapping of the porcine erythropoietin gene to chromosome 3p16-p15 and ordering of four related subclones by fiber-FISH and DNA-combing. In: *Hereditas* 128 (1), S. 77–81.

Livnah, O. (1999): Crystallographic Evidence for Preformed Dimers of Erythropoietin Receptor Before Ligand Activation. In: *Science* 283 (5404), S. 987–990.

Lunney, Joan K.; Chen, Hongbo (2010): Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. In: *Virus Res* 154 (1-2), S. 161–169.

Luo, Weizhen; Chen, Shaokang; Cheng, Duxue; WANG, Ligang; LI, Yong; Ma, Xiaojun et al. (2012): Genome-wide association study of porcine hematological parameters in a Large White × Minzhu F2 resource population. In: *Int. J. Biol. Sci.* 8 (6), S. 870–881.

MacIntyre, N.; Smith, DG; Shaw, DJ; Thomson, JR; Rhind, SM (2003): Immunopathogenesis of experimentally induced proliferative enteropathy in pigs. In: *VetPathol.* 40 (4), S. 421-32.

Maouche, L.; Cartron, J. P.; Chretien, S. (1994): Different domains regulate the human erythropoietin receptor gene transcription. In: *Nucleic Acids Res* 22 (3), S. 338–346.

Maouche, L.; Tournamille, C.; Hattab, C.; Boffa, G.; Cartron, J. P.; Chretien, S. (1991): Cloning of the gene encoding the human erythropoietin receptor. In: *Blood* 78 (10), S. 2557–2563.

Marklund, S.; Kijas, J.; Rodriguez-Martinez, H.; Rönstrand, L.; Funa, K.; Moller, M. et al. (1998): Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig. In: *Genome Res.* 8 (8), S. 826–833.

Marks, Fernanda S.; Reck, José; Almeida, Laura L.; Berger, Markus; Corrêa, André M.R; Driemeier, David et al. (2010): Porcine circovirus 2 (PCV2) induces a procoagulant state in naturally infected swine and in cultured endothelial cells. In: *Veterinary Microbiology* 141 (1-2), S. 22–30.

Marshall, K.; Mugambi, J. M.; Nagda, S.; Sonstegard, T. S.; van Tassell, C. P.; Baker, R. L.; Gibson, J. P. (2013): Quantitative trait loci for resistance to *Haemonchus contortus* artificial challenge in Red Maasai and Dorper sheep of East Africa. In: *Anim. Genet.* 44 (3), S. 285–295.

Martin, D. I.; Orkin, S. H. (1990): Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. In: *Genes Dev* 4 (11), S. 1886–1898.

Mastrogiannaki, Maria; Matak, Pavle; Keith, Brian; Simon, M. Celeste; Vaultont, Sophie; Peyssonnaud, Carole (2009): HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. In: *J. Clin. Invest.* 119 (5), S. 1159–1166.

Ma, Wanlong; Kantarjian, Hagop; Zhang, Ke; Zhang, Xi; Wang, Xiuqiang; Chen, Clifford et al. (2010): Significant association between polymorphism of the erythropoietin gene promoter and myelodysplastic syndrome. In: *BMC Med Genet* 11 (1), S. 163.

Maxwell, P. H.; Ferguson, D. J.; Osmond, M. K.; Pugh, C. W.; Heryet, A.; Doe, B. G. et al. (1994): Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. In: *Blood* 84 (6), S. 1823–1830.

Maxwell, P. H.; Osmond, M. K.; Pugh, C. W.; Heryet, A.; Nicholls, L. G.; Tan, C. C. et al. (1993): Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. In: *Kidney Int* 44 (5), S. 1149–1162.

Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S.; Chang, G. W.; Clifford, S. C.; Vaux, E. C.; Cockman, M. E. et al. (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. In: *Nature* 399 (6733), S. 271–275.

McLeod, D. L.; Shreeve, M. M.; Axelrad, A. A. (1974): Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies in vitro: quantitative assay method for CFU-E. In: *Blood* 44 (4), S. 517–534.

McOrist, S.; Macintyre, N.; Stokes, C. R.; Lawson, G. H. (1992): Immunocytological responses in porcine proliferative enteropathies. In: *Infect. Immun.* 60 (10), S. 4184–4191.

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: II. Comparison of additive direct and maternal genetic effects. In: *J. Anim. Sci* 64 (2), S. 414–419.

Mendoza, S. M.; Konishi, T.; Miller, C. W. (1998): Integration of SV40 in human osteosarcoma DNA. In: *Oncogene* 17 (19), S. 2457–2462.

Merika, M.; Orkin, S. H. (1993): DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. In: *Mol. Cell. Biol.* 13 (7), S. 3999–4010.

Merika, M.; Orkin, S. H. (1995): Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLF. In: *Mol. Cell. Biol.* 15 (5), S. 2437–2447.

Miller, B. A.; Scaduto, R. C.; Tillotson, D. L.; Botti, J. J.; Cheung, J. Y. (1988): Erythropoietin stimulates a rise in intracellular free calcium concentration in single early human erythroid precursors. In: *J. Clin. Invest* 82 (1), S. 309–315.

Miura, O.; D'Andrea, A.; Kabat, D.; Ihle, J. N. (1991): Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. In: *Mol. Cell. Biol* 11 (10), S. 4895–4902.

Miura, O.; Nakamura, N.; Ihle, J. N.; Aoki, N. (1994a): Erythropoietin-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with tyrosine-phosphorylated erythropoietin receptor. In: *J. Biol. Chem* 269 (1), S. 614–620.

Miura, Y.; Miura, O.; Ihle, J. N.; Aoki, N. (1994b): Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. In: *J. Biol. Chem* 269 (47), S. 29962–29969.

Molkentin, J. D. (2000): The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. In: *J. Biol. Chem.* 275 (50), S. 38949–38952.

Morton, N. E. (1955): Sequential tests for the detection of linkage. In: *Am. J. H. Genetics* 7, S. 277-318

Mosley, B.; Beckmann, M. P.; March, C. J.; Idzerda, R. L.; Gimpel, S. D.; VandenBos, T. et al. (1989): The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. In: *Cell* 59 (2), S. 335–348.

Murre, C.; Bain, G.; van Dijk, M. A.; Engel, I.; Furnari, B. A.; Massari, M. E. et al. (1994): Structure and function of helix-loop-helix proteins. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1218 (2), S. 129–135.

Naessens, J. (2006): Bovine trypanotolerance: A natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome? In: *Int. J. Parasitol* 36 (5), S. 521–528.

Nairz, Manfred; Schroll, Andrea; Moschen, Alexander R.; Sonnweber, Thomas; Theurl, Milan; Theurl, Igor et al. (2011): Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B-inducible immune pathways. In: *Immunity* 34 (1), S. 61–74.

Nakamura, Y.; Tokumoto, Y.; Nakauchi, H. (1996): Role of a truncated erythropoietin receptor for erythroid differentiation. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 218 (1), S. 205–209.

Nelson, N. J. (2001): Debate on the link between SV40 and human cancer continues. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (17), S. 1284–1286.

Nemeth, E. (2002): Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. In: *Blood* 101 (7), S. 2461–2463.

Noguchi, C. T.; Bae, K. S.; Chin, K.; Wada, Y.; Schechter, A. N.; Hankins, W. D. (1991): Cloning of the human erythropoietin receptor gene. In: *Blood* 78 (10), S. 2548–2556.

O'Donoghue, P.; Rommel, M. (1992): Australian-German collaborative studies on the immunology of *Sarcocystis* infections. In: *Angew Parasitol* 33 (2), S. 102–119.

Onteru, S. K.; Fan, B.; Du, Z-Q; Garrick, D. J.; Stalder, K. J.; Rothschild, M. F. (2012): A whole-genome association study for pig reproductive traits. In: *Anim. Genet.* 43 (1), S. 18–26.

Opriessnig, T.; Fenaux, M.; Thomas, P.; Hoogland, M. J.; Rothschild, M. F.; Meng, X. J.; Halbur, P. G. (2006): Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. In: *Vet. Pathol* 43 (3), S. 281–293.

Opriessnig, T.; Meng, X.-J; Halbur, P. G. (2007): Porcine Circovirus Type 2-Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19 (6), S. 591–615.

Orkin, S. H. (1990): Globin gene regulation and switching: circa 1990. In: *Cell* 63 (4), S. 665–672.

Orru, L.; Abeni, F.; Catillo, G.; Grandoni, F.; Crisa, A.; Matteis, G. de et al. (2012): Leptin gene haplotypes are associated with change in immunological and hematological variables in dairy cow during the peripartum period. In: *Journal of Animal Science* 90 (1), S. 16–26.

Pearson, P. L.; Smith, T. P.; Sonstegard, T. S.; Klemcke, H. G.; Christenson, R. K.; Vallet, J. L. (2000): Porcine erythropoietin receptor: molecular cloning and expression in embryonic and fetal liver. In: *Domest. Anim. Endocrinol* 19 (1), S. 25–38.

Penny, L. A.; Forget, B. G. (1991): Genomic organization of the human erythropoietin receptor gene. In: *Genomics* 11 (4), S. 974–980.

Periasamy K.; Pichler R.; Poli M.; Cristel S.; Cetrá B.; Medus D.; Basar M.; Thiruvankadan AK.; Ramasamy S.; Ellahi M. B.; Mohammed F.; Teneva A.; Shamsuddin M.; Podesta M. G.; Diallo A. (2014): Candidate gene approach for parasite

resistance in sheep--variation in immune pathway genes and association with fecal egg count. In: *PLoS One* 9(2)

Peters, Luanne L.; Lambert, Amy J.; Zhang, Weidong; Churchill, Gary A.; Brugnara, Carlo; Platt, Orah S. (2006): Quantitative trait loci for baseline erythroid traits. In: *Mamm. Genome* 17 (4), S. 298–309.

Pevny, L.; Simon, M. C.; Robertson, E.; Klein, W. H.; Tsai, S. F.; D'Agati, V. et al. (1991): Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. In: *Nature* 349 (6306), S. 257–260.

Peyssonnaud, Carole; Zinkernagel, Annelies S.; Schuepbach, Reto A.; Rankin, Erinn; Vaultont, Sophie; Haase, Volker H. et al. (2007): Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). In: *J. Clin. Invest.* 117 (7), S. 1926–1932.

Plonait, Hans; Waldmann, Karl-Heinz; Bickhardt, Klaus (2004): Lehrbuch der Schweinekrankheiten. 63 Tabellen. 4. Aufl. Stuttgart: Parey.

Preissler, R; Tetens, J.; Reiners, K.; Looft, H.; Kemper, N. (2013): A genome-wide association study to detect genetic variation for postpartum dysgalactia syndrome in five commercial pig breed lines. In: *Animal Genet.* 44 (5), S. 502-508.

Przytulski, T.; Porzeczowska, D. (1980): Studies on genetic resistance to leptospirosis in pigs. In: *Br. Vet. J* 136 (1), S. 25–32.

Pschyrembel, Willibald (2002): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 259. Aufl. Berlin, New York: De Gruyter.

Quelle, D. E.; Quelle, F. W.; Wojchowski, D. M. (1992): Mutations in the WSAWSE and cytosolic domains of the erythropoietin receptor affect signal transduction and ligand binding and internalization. In: *Mol. Cell. Biol* 12 (10), S. 4553–4561.

Ramos, Antonio M.; Crooijmans, Richard P. M. A.; Affara, Nabeel A.; Amaral, Andreia J.; Archibald, Alan L.; Beever, Jonathan E. et al. (2009): Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. In: *PLoS ONE* 4 (8), S. e6524.

Rankin, Erinn B.; Biju, Mangatt P.; Liu, Qingdu; Unger, Travis L.; Rha, Jennifer; Johnson, Randall S. et al. (2007): Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. In: *J. Clin. Invest* 117 (4), S. 1068–1077.

Reiner, G.; Eckert, J.; Peischl, T.; Bochert, S.; Jäkel, T.; Mackenstedt, U. et al. (2002a): 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.; Fischer, R.; Hepp, S.; Berge, T.; Köhler, F.; Willems, H. (2007): Quantitative trait loci for red blood cell traits in swine. In: *Animal Genetics* 38 (5), S. 447–452.

Reiner, G.; Fischer, R.; Hepp, S.; Berge, T.; Köhler, F.; Willems, H. (2008): Quantitative Trait Loci in white blood cells in swine. In: *Animal. Genet.* 39 (2), S. 136–168.

Reiner, G.; Clemens, N.; Fischer, R.; Köhler, F.; Berge, T.; Hepp, S.; Willems, H. (2009): Mapping of Quantitative Trait Loci in clinical-chemical traits in swine, In: *Animal Genet* 40 (1), S.57-64.

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: *J. Anim. Breed. Genet* 127 (2), S. 100–106.

Reiner, G.; Clemens, N.; Lohner, E.; Willems, H. (2010): SNPs in the porcine GOT1 gene improve a QTL for serum aspartate aminotransferase activity on SSC14. In: *Anim. Genet* 41 (3), S 319-323.

Reiner, Gerald; Melchinger, Elke; Kramarova, Marcela; Pfaff, Eberhardt; Büttner, Matthias; Saalmüller, Armin; Geldermann, Hermann (2002b): Detection of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to pseudorabies virus in swine. In: *J. Gen. Virol* 83 (Pt 1), S. 167–172.

Reiner, Gerald; Kliemt, Darmaris; Willems, Hermann; Berge, Thomas; Fischer, Reiner; Köhler, Florian; Hepp, Sabine; Hertrampf, Barbara; Dauschies, Arwied; Geldermann, Hermann; Mackenstedt, Ute; Zahner, Horst (2007): Mapping of Quantitative Trait Loci affecting resistance/susceptibility to *Sarcocystis miescheriana* in swine. In: *Genomics* 89 (5), S. 638-646.

Reiner, Gerald; Bertsch, Natalie; Hoeltig, Doris; Selke, Martin; Willems, Hermann; Gerlach, Gerald Friedrich; Tuemmler, Burkhard; Probst, Inga; Herwig, Ralf; Drungowski, Mario; Waldmann, Karl Heinz: Identification of QTL affecting resistance/susceptibility to acute *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. In: *Mamm Genome* 25 (3-4), S. 180-191.

---

**REISSMANN, K. R. (1950): Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. In: *Blood* 5 (4), S. 372–380.**

**Remy, I.; Wilson, I. A.; Michnick, S. W. (1999): Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. In: *Science* 283 (5404), S. 990–993.**

**Ren, H. Y.; Komatsu, N.; Shimizu, R.; Okada, K.; Miura, Y. (1994): Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 in a human erythropoietin-dependent cell line. In: *J. Biol. Chem* 269 (30), S. 19633–19638.**

**Richmond, Terri D.; Chohan, Manprit; Barber, Dwayne L. (2005): Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. In: *Trends Cell Biol* 15 (3), S. 146–155.**

**Rizzo, P.; Di Resta, I.; Stach, R.; Mutti, L.; Picci, P.; Kast, W. M. et al. (1998): Evidence for and implications of SV40-like sequences in human mesotheliomas and osteosarcomas. In: *Dev. Biol. Stand.* 94, S. 33–40.**

**Robb, L.; Lyons, I.; Li, R.; Hartley, L.; Köntgen, F.; Harvey, R. P. et al. (1995): Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (15), S. 7075–7079.**

**Roberts, C. J.; Gray, A. R. (1973): Studies on trypanosome-resistant cattle. II. The effect of trypanosomiasis on N'dama, Muturu and Zebu cattle. In: *Trop Anim Health Prod* 5 (4), S. 220–233.**

**Rogers, Heather; Wang, Li; Yu, Xiaobing; Alnaeeli, Mawadda; Cui, Kairong; Zhao, Keji et al. (2012): T-cell Acute Leukemia 1 (TAL1) regulation of erythropoietin receptor and association with excessive erythrocytosis. In: *J. Biol. Chem.***

**Rolle, Michael; Mayr, Anton (2007): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 8. Aufl. Stuttgart: Enke.**

**Rommel, M. (1979): Die Sarkosporidiose der Haustier und des Menschen. In: *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr* (92), S. 457–464.**

**Roodman, G. D. (1987): Mechanisms of erythroid suppression in the anemia of chronic disease. In: *Blood Cells* 13 (1-2), S. 171–184.**

**Roodman, G. D.; Bird, A.; Hutzler, D.; Montgomery, W. (1987): Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of**

erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60, and HEL cells. In: *Exp. Hematol.* 15 (9), S. 928–935.

Rothschild, M. F.; Hill, H. T.; Christian, L. L.; Warner, C. M. (1984): Genetic differences in serum-neutralization titers of pigs after vaccination with pseudorabies modified live-virus vaccine. In: *Am. J. Vet. Res* 45 (6), S. 1216–1218.

Russell, E. S. (1979): Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. In: *Adv. Genet.* 20, S. 357–459.

Saito, M.; Shibata, Y.; Ohno, A.; Kubo, M.; Shimura, K.; Itagaki, H. (1998): Sarcocystis sui hominis detected for the first time from pigs in Japan. In: *J. Vet. Med. Sci* 60 (3), S. 307–309.

Sakurai, M.; Zhou, J. H.; Ohtaki, M.; Itoh, T.; Murakami, Y.; Yasue, H. (1996): Assignment of c-KIT gene to swine chromosome 8p12-p21 by fluorescence in situ hybridization. In: *Mamm. Genome* 7 (5), S. 397.

Saleque, A.; Bhatia, B. B. (1991): Prevalence of Sarcocystis in domestic pigs in India. In: *Vet. Parasitol* 40 (1-2), S. 151–153.

Schartl, Manfred; Arand, Michael (2009): Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. Große Falttafel mit Stoffwechselübersicht ; [mit herausnehmbarer Stoffwechselkarte & interaktiver Lerneinheit zum Citratzyklus ; mit dem Plus im Web ; Zugangscodex im Buch]. München: Elsevier Urban & Fischer.

Schnorr, Bertram; Kressin, Monika (2011): Embryologie der Haustiere. 6. Aufl. Stuttgart: Enke.

Schock, Gerald; Gildehaus, Nina; Lubenow, Helge; Löffert, Dirk; Korfhage, Christian (2005): Unbegrenzte DNA-Analysen durch Multiple Displacement Amplification. In: *BIOspektrum* 11 (6), S. 781–782.

Scortegagna, Marzia; Ding, Kan; Zhang, Quiyang; Oktay, Yavuz; Bennett, Michael J.; Bennett, Michael et al. (2005): HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. In: *Blood* 105 (8), S. 3133–3140.

Semenza, G. L.; Wang, G. L. (1992): A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. In: *Mol Cell Biol* 12 (12), S. 5447–5454.

Serebrin, S.; Rosendal, S.; Valdivieso-Garcia, A.; Little, P. B. (1991): Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: *Res. Vet. Sci.* 50 (1), S. 18–22.

Shoemaker, C. B.; Mitsock, L. D. (1986): Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. In: *Mol. Cell. Biol.* 6 (3), S. 849–858.

Silva, M. V. B.; Sonstegard, T. S.; Hanotte, O.; Mugambi, J. M.; Garcia, J. F.; Nagda, S. et al. (2012): Identification of quantitative trait loci affecting resistance to gastrointestinal parasites in a double backcross population of Red Maasai and Dorper sheep. In: *Anim. Genet.* 43 (1), S. 63–71.

Simmen, R. C.; Zhang, X. L.; Zhang, D.; Wang, Y.; Michel, F. J.; Simmen, F. A. (2000): Expression and regulatory function of the transcription factor Sp1 in the uterine endometrium at early pregnancy: implications for epithelial phenotype. In: *Mol. Cell. Endocrinol.* 159 (1-2), S. 159–170.

Smith, D. G.; Lawson, G. H. (2001): *Lawsonia intracellularis*: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy. In: *Vet. Microbiol.* 82 (4), S. 331–345.

Sørensen, K. K.; Gregersen, V. R.; Christensen, O. F.; Velandar, I. H.; Bendixen, C. (2011): Genomic regions associated with ventro-cranial chronic pleuritis in pig. In: *J. Anim. Breed. Genet.* 128 (4), S. 314–318.

Sorg, H.; Kuhbier, J. W.; Menger, B.; Reimers, K.; Harder, Y.; Vogt, P. M. (2010): Die Rolle von Erythropoietin bei der Verbesserung der Wundheilung. In: *Chirurg* 81 (11), S. 993–998.

Soutoglou, E.; Violette, B.; Vaxillaire, M.; Yaniv, M.; Pontoglio, M.; Talianidis, I. (2001): Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. In: *EMBO J* 20 (8), S. 1984–1992.

Stankewitz, Stephanie (2008): Immunologische und parasitologische Untersuchungen zur natürlichen Krankheitsresistenz gegenüber *Sarcocystis miescheriana* beim Schwein. 1. Aufl. Giessen: VVB Laufersweiler.

Stephenson, J. R.; Axelrad, A. A.; McLeod, D. L.; Shreeve, M. M. (1971): Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin in vitro. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68 (7), S. 1542–1546.

Stockmann, Christian; Fandrey, Joachim (2006): Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33 (10), S. 968–979.

Taniguchi, S.; Dai, C. H.; Price, J. O.; Krantz, S. B. (1997): Interferon gamma downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells. In: *Blood* 90 (6), S. 2244–2252.

Thuy, N. T. D.; Melchinger-Wild, E.; Kuss, A. W.; Cuong, N. V.; Bartenschlager, H.; Geldermann, H. (2006): Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites. In: *J. Anim. Sci* 84 (10), S. 2601–2608.

Tong, Zongzhong; Yang, Zhenglin; Patel, Shrena; Chen, Haoyu; Gibbs, Daniel; Yang, Xian et al. (2008): Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (19), S. 6998–7003.

Tsai, S. F.; Martin, D. I.; Zon, L. I.; D'Andrea, A. D.; Wong, G. G.; Orkin, S. H. (1989): Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. In: *Nature* 339 (6224), S. 446–451.

Tsang, Alice P.; Visvader, Jane E.; Turner, C. Alexander; Fujiwara, Yuko; Yu, Channing; Weiss, Mitchell J. et al. (1997): FOG, a Multitype Zinc Finger Protein, Acts as a Cofactor for Transcription Factor GATA-1 in Erythroid and Megakaryocytic Differentiation. In: *Cell* 90 (1), S. 109–119.

Tsuchiya, T.; Okada, M.; Ueda, M.; Yasukochi, Y. (1997): Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 region. In: *J. Biochem* 121 (2), S. 193–196.

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.

Umemura, T.; Papayannopoulou, T.; Stamatoyannopoulos, G. (1989): The mechanism of expansion of late erythroid progenitors during erythroid regeneration: target cells and effects of erythropoietin and interleukin-3. In: *Blood* 73 (7), S. 1993–1998.

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.

Vallet, J. L.; Freking, B. A.; Leymaster, K. A.; Christenson, R. K. (2005): Allelic variation in the erythropoietin receptor gene is associated with uterine capacity and litter size in swine\*. In: *Animal Genetics* 36 (2), S. 97–103.

Wall, L.; deBoer, E.; Grosveld, F. (1988): The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. In: *Genes Dev* 2 (9), S. 1089–1100.

Wang, Chang Q.; Udupa, Kodetthoor B.; Lipschitz, David A. (1995): Interferon- $\gamma$  exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. In: *J. Cell. Physiol.* 162 (1), S. 134–138.

Wang, J. Y.; Luo, Y. R.; Fu, W. X.; Lu, X.; Zhou, J. P.; Ding, X. D. et al. (2013): Genome-wide association studies for hematological traits in swine. In: *Anim. Genet.* 44 (1), S. 34–43.

Wattrang, E.; Almqvist, M.; Johansson, A.; Fossum, C.; Wallgren, P.; Pielberg, G. et al. (2005): Confirmation of QTL on porcine chromosomes 1 and 8 influencing leukocyte numbers, haematological parameters and leukocyte function. In: *Anim. Genet* 36 (4), S. 337–345.

Weber, M.; Weyreter, H.; O'Donoghue, P. J.; Rommel, M.; Trautwein, G. (1983): Persistence of acquired immunity to *Sarcocystis miescheriana* infection in growing pigs. In: *Vet. Parasitol.* 13 (4), S. 287–297.

Weiss, Günter (2009): Iron metabolism in the anemia of chronic disease. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (7), S. 682–693.

Wen, D.; Boissel, J. P.; Tracy, T. E.; Gruninger, R. H.; Mulcahy, L. S.; Czelusniak, J. et al. (1993): Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. In: *Blood* 82 (5), S. 1507–1516.

Wenger, Roland H.; Kvietikova, Ivica; Rolfs, Andreas; Camenisch, Gieri; Gassmann, Max (1998): Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. In: *Eur J Biochem* 253 (3), S. 771–777.

Wintour, E. M.; Butkus, A.; Earnest, L.; Pompolo, S. (1996): The erythropoietin gene is expressed strongly in the mammalian mesonephric kidney. In: *Blood* 88 (9), S. 3349–3353.

Witthuhn, B. A.; Quelle, F. W.; Silvennoinen, O.; Yi, T.; Tang, B.; Miura, O.; Ihle, J. N. (1993): JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. In: *Cell* 74 (2), S. 227–236.

Wrighting, D. M.; Andrews, N. C. (2006): Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. In: *Blood* 108 (9), S. 3204–3209.

Yang, H. Y.; Evans, T. (1992): Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. In: *Mol. Cell. Biol.* 12 (10), S. 4562–4570.

Yelamarty, R. V.; Miller, B. A.; Scaduto, R. C.; Yu, F. T.; Tillotson, D. L.; Cheung, J. Y. (1990): Three-dimensional intracellular calcium gradients in single human burst-forming units-erythroid-derived erythroblasts induced by erythropoietin. In: *J. Clin. Invest* 85 (6), S. 1799–1809.

Yin, H.; Blanchard, K. L. (2000): DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. In: *Blood* 95 (1), S. 111–119.

Yoshimura, A.; Zimmers, T.; Neumann, D.; Longmore, G.; Yoshimura, Y.; Lodish, H. F. (1992): Mutations in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing, ligand binding, and activation of the receptor. In: *J. Biol. Chem* 267 (16), S. 11619–11625.

Youssoufian, H.; Zon, L. I.; Orkin, S. H.; D'Andrea, A. D.; Lodish, H. F. (1990): Structure and transcription of the mouse erythropoietin receptor gene. In: *Mol Cell Biol* 10 (7), S. 3675–3682.

Zhang, Zhiyan; Hong, Yuan; Gao, Jun; Xiao, Shijun; Ma, Junwu; Zhang, Wanchang; Ren, Jun; Huang, Lusheng (2013): Genome-wide Association Study Reveals Constant Specific Loci for Hematological Traits at Three Time Stages in a White Duroc x Erhulian F2 Resource Population. In: *PLoS One* 8 (5), e63665

Zhang, Feng; Zhang, Zhiyan; Yan, Xueming; Chen, Hao; Zhang, Wanchang; Hong, Yuan; Huang, Lusheng (2014), In: *BMC Genetics*, 15:41

Zaremba, W. (2002): Eisenversorgung der Saugferkel. In: *SachsenPost Schwein* 2002 (21), S. 30–33.

ZHANG, Longchao; WANG, Ligang; LI, Yong; LI, Wen; YAN, Hua; LIU, Xin et al. (2011a): A substitution within erythropoietin receptor gene D1 domain associated with litter size in Beijing Black pig, *Sus scrofa*. In: *Animal Science Journal* 82 (5), S. 627–632.

ZHANG, Long-chao; WANG, Li-gang; LI, Yong; YAN, Hua; ZHAO, Ke-bin; WANG, Li-xian (2011b): Erythropoietin Receptor Gene (EPOR) Polymorphisms are Associated with Sow Litter Sizes. In: *Agricultural Sciences in China* 10 (6), S. 931–937.

---

Zhao, Wei; Kitidis, Claire; Fleming, Mark D.; Lodish, Harvey F.; Ghaffari, Saghi (2006): Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. In: *Blood* 107 (3), S. 907–915.

Zielasko, B.; Petrich, J.; Trautwein, G.; Rommel, M. (1981): Untersuchungen über pathologisch-anatomische Veränderungen und die Entwicklung der Immunität bei der *Sarcocystis suicanis*-Infektion. In: *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr* 94 (11-12), S. 223–228.

Zimmer, Michael; Ebert, Benjamin L.; Neil, Christopher; Brenner, Keith; Papaioannou, Ioannis; Melas, Antonia et al. (2008): Small-molecule inhibitors of HIF-2 $\alpha$  translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. In: *Mol. Cell* 32 (6), S. 838–848.

Zon, L. I.; Youssoufian, H.; Mather, C.; Lodish, H. F.; Orkin, S. H. (1991): Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88 (23), S. 10638–10641.

Zou, Zhengzhi; Ren, Jun; Yan, Xueming; Huang, Xiang; Yang, Shujin; Zhang, Zhiyan et al. (2008): Quantitative trait loci for porcine baseline erythroid traits at three growth ages in a White Duroc x Erhualian F(2) resource population. In: *Mamm. Genome* 19 (9), S. 640–646.

## 9 Anhang

### Gen für Erythropoetin, Exon 1-5 (GenBank Acc.No. AJ249746)

```
1 gagctcttaa agaattttgt gggagttacc atcatggctc agcagaatcg agtctgacta
61 gcatccatga ggatgcaggt tcgatccctg gtccctgctca gtgggttaag gatccagtg
121 tgccatgagc tgtggagtag gtccgagatg tggcttggtg aggccctaaa aagaccccc
181 ccaaaaaaag aattttgtca cacagattag cctaaaagtt cagtatctgg cttttcaggg
241 tcctagaagg gggggagaag accccccaaa tttcttgctc tgtgcgcccc cactaaatt
301 cctcaacaaa acgacactag tttctagaac aagaactggg attttgagga ggccactggt
361 gtgccccacc agcacctttt cggcttccac acccagatgc cttgcagtcc cagctctgag
421 tctccgcca agatggggac acccccttct ccagagggcc gtcgggtca ccagtctttc
481 ccagaatggc actgctttcc cagcgcagcc ttctgcccac ccagctgaga gcaccacct
541 gcaccttcag gaactcaggg atcgggcggg tagccccgtg ccccgcccc gcgcccgtg
601 gtctcactcc cctgagggcc cccgaccag gcgtcctgcc cgggtctga cccctccggc
661 ccacacctcc cgcgacctt cacgcacaca gcctcccccc aacccccac acgcacgcac
721 acagctgata acagccccga cccccggccg ccgcccagc ccccggcca accccggccc
781 gtcgcctcgc ctgcctcctc tccggacct ggctgggggc cctgagggc tctgttccga
841 cccgcctcgc ggggtcccgg acagcagccc cctccttagg gcggagaggt ggccctgtcc
901 cgccaggctt tccaggatgc gggctcccgg cgcggcacc cgccaagccc caggacgctg
961 aggggcccgg cgaggcgcgg agatgggggc gcgcggtgag tactccccgc cggccgcca
1021 gcccctggtt gaggaggaat ttaccgctgg ggctgttggc cccgaggggg ctaggttcaa
1081 ggacctgaga cttgccaagg accccggaag ggcaaggggg gtggggcagc tttcacctgc
1141 cggcggggct tggggagtcc cgggcaagt cgaaacttga gctgggaccg ggtggaggtt
1201 tacaggtcca ggggaaagag gggctgctat gtgggtgacg agaaagctga tacctggacc
1261 tgggagcagc aaccgggatc tgcgagaggg gaagcttctg tcacaccggg attgaagttt
1321 ggccgggaca agtggattcc ggtagtggg ggggtggggtg tgcacgcggc cgcgggattg
1381 aatgaaggca aaggaggcag agcctgcgcg ctgcgaaggt tggggtcggg acggctggct
1441 gggggccagg cggccggatg ggtgaacctg tccgtctaaa ccaaccctt tctgcaatg
1501 cccagcctca cattcagcct ggctctcttt cctagaatgt cctgcccggc tgcttctgct
1561 gtccttgctg ctgcttctc tgggctccc agtcctgggc gccccccac gcctcatctg
1621 tgacagccga gtcctggaga ggtacatctt ggaggccaag gagggcgaag atgccacggt
1681 gaggccccctc cccaggatct tccacaggtc tcattctcag gatttcaggg tctcctccaa
1741 gatccaggaa cctggaactg gtttcagggg tggaggtggg gagccagagc ccccagcaaa
1801 agtgataaaa gtggtagtcc catcacaat ctggaagcta ggtaaggggc agggccggca
1861 ggagcccttg gggcccctga ctccaggatt gtgcattgca gatgggctgt gccgaaagct
1921 gcagcttcag tgagaatata actgtcccag acaccaaggt taacttctat gcctggaaga
1981 ggatggaggt gagttccttt ttccgcttct cttgggaagt ctcaattggg gaacctcata
2041 ggggtgggaag gagaatgaca gtgagagaaa aaacggagca gcaaagatga gggctgaatg
2101 gaatctgtta attcgttcat tcatttgctt attcattcaa caaaacttgt gttggcttg
2161 ggccgctgag aagaaggagg gaggggctgg cttgggccag ctgactctga gtctctggtc
```

2221 tcttcaggtc cagcagcagg ccatggaggt ctggcagggc ctggccctgc tctcagaagc  
 2281 catcctgcag ggcaggccc tgttggccaa ctctcccag ccatctgagg ccctgcagct  
 2341 gcatgtggac aaagctgtca ggggctgcg cagcctcacc tccctgcttc gggcgctggg  
 2401 agcccagggtg tgtaggactc tccctcacac ttgtgttgcc ctttctggaa agtgggagga  
 2461 gggccctgcc aaggaaatgc cagggctctc cttgtcccc ctgtgattct atcctgaacc  
 2521 ccatgtccct ctggggctcc cggcactgca gtaaacttct gttctcttct tggcagaagg  
 2581 aagccatccc ccttccagac gcatccccct cctctgccac cccactccga acatttgctg  
 2641 ttgatacttt gtgcaaactt ttccgcaact actccaattt cctgcgggga aagctgacgc  
 2701 tgtacactgg agaggcctgc aggagaaggg acagggtgact tgggtgctccc acccggggca  
 2761 tgtccaccac ttcgctcacc accactgctt gtgccatgcc ttctgcacct ccaactccaa  
 2821 cccccgctga ggggcatca gctcagcgc agcctgtccc atggacactc cagggccagc  
 2881 ggtgacatct caagggctaa aggaaccgtc cagagctcaa ctccagaccta aggatgtcac  
 2941 ggggcccagcc tgagccccc aagcaggagg aattcagaga tcagcttaa cttggggaca  
 3001 gtgccagtct ggggcagaca gtgagactca tcttggcgcc ctgcacaact gtgatgcctg  
 3061 gacaagctgg agggaaaata cctccttctg cacctaccaa gcagggacag aatggactgg  
 3121 agaatttagg aggcaagcca tgaattctcc aggtctcatg gagactccca caacagcaag  
 3181 agcccactgg acaaggaggg tgggtgggagc cgtgacggga tgggggctgg ccctggctc  
 3241 tcaactaggtc caagttttgt gtatttttca atctcactgg caagaactga aaccacaacc  
 3301 tggctcttgg cttttctctt ttctgggag cccctactt ccctggttct gccctatcct  
 3361 ggcagtaggc agcaggctctg ggaaaccaga agtggagggg gttgggcccct acgtgcagcc  
 3421 ttgcatggcc tgtctgacct cttgacccca ctgggctga ggccacagct ctgcccacgc  
 3481 tgggtcaataa ggtggctcca ttcaaggcta gtccctcagta ggcagctgcc aactggccca  
 3541 ggataagtct ttagtgagcc tgggctgcca gcaaggagat aatggccagg aagaagggcc  
 3601 ccttgggggc tgggtggcagc tgtcaacact ggccactgga cccttattat tttctgcctc  
 3661 ctctctgtgg gcccttcttc taatgccacc ttgccagaat cagcctttgg caccttaacg  
 3721 cacaacgcc ctctgaatcc agtggatctt tcttgtctg gggacgggta ccattaatgc  
 3781 tctacctgaa acctgcagaa gggctacaga taatgggtgt gtaaaaacca tctcccaggg  
 3841 aaccatctca ttgatcatca ctgccacact actc

### **Genesequenz von EpoRezeptor (GenBank Acc.No. EU 407778)**

1 cgacattgct gacttgactc tagaacttgg aggcgcctgg ccgggaaggg cctggtcagc  
 61 tgtgtccggg ggaggcagct gctgaccag ctgtggactg tgccggggcg gaagaagggg  
 121 gggcaggagc cctgggccc cegtggcagg ggctgcatca tgtatcattt cggggcaacc  
 181 ctctggccag gagttggctc cctctgtctt ctgctagctg gggccacctg ggctccttca  
 241 cccaactccc ccgacgcca gtttgaaagc aaaggtaagg atggacctga gtttggaggg  
 301 aatgctggg gcctgaacgt ccagcctggg tcttggggtc tatgccggtt tttgaacctt  
 361 caatctatgt tctgggggccc caagctgata tctgagcccc tagactggga cctgatatag  
 421 catgctgggg tctatatccc caggctgggt tctagcagag aagttacaga ggggcattag  
 481 agtcctgttt tatcttttca gggaccctgg taacatgcta aaccctaaat gggaaagagc  
 541 tgggtgctggg tctaggccct gctgtctaga gtctctgagg tgagggagcc gaccctctag

---

601 aggggggaggg aggattaaac ctaggtccta gtcagagggg cgggaccgca ggctactgta  
661 aacacggttt tcaagcagac gccagatccc tgggtccgcg gagttgaggg aggggggcaa  
721 ggggcacggg tggcgctatc gggcagccgg gagcctgccg gggccgatag ggggccccgc  
781 ctctacaca cacacactca cccgcacgca tgtcttgagt tggggcgggt cgggtcgcgg  
841 gaagcggagg ccttgaatgc agcgcctcagc tcagcccgtc tcgggggtggg cgggtgtgtg  
901 tagcgagaca gtaagacacg caaccgacgc ttgggagttc ggggggcacc acttctgcgg  
961 acccctggaa gggccccgc ttgggcagtg cgcggggcgg gacatttctt atcggttcgc  
1021 acaggcagcg ggagggaggg gaggatgcct tggcccaggg acgaggacgg gtctcgggtc  
1081 tcctgacccc ctctctgcc ctcatcccca gcggccctgt tggcagcccg cgggcctgaa  
1141 gagcttctgt gcttcaccga gcggttggag gacttggtgt gcttctggga ggaagcggga  
1201 agcgcctggag taggcccaga agactacagc ttctcctacc agcttgagtg agtccaacga  
1261 agcaggtgga gcgccctaca ggggtagggg atgggcgggg cgggcaaagt tccccggagc  
1321 tcgcaccttg ggatgtctcc tgggtgcggg gccggatggc acctctgctg gtggtcacta  
1381 gtgggaagcc cgcgggggtca gggttgacac gccccctagt ggccggggct ggaacagtcc  
1441 cttattcacc gctggagtgc gatcccaaac actgctgaga ggacaccgct ccaaatcggc  
1501 accaaggcgt cgcgtacgtc ggggctggga cgcgccctgg tggtagtgtt cagaacgcgc  
1561 tcttggtcag ggcaatactt cccaaattgc tcccttcctt cgctggctcc tcggggaaca  
1621 ggggtgagcc gtggaagcca tgccacctgc atcaagggcc cacggcccgc ggctcgggtc  
1681 gtttctggtg ctgcctgcct acagccgaca cgtcagcctt cgtgccccta gagctgcgcg  
1741 tcaactgaggt ttctcggggc gctccacgct accaccgtat catccacatc aacgaagtgg  
1801 gtaagtgcac tgggaaaggg ggagtgttaa ggaggggtcc tagtttctgc tcaactgagc  
1861 aaccgctctc cgcagtgctg ctagaccctc ccgctgggct gctggcacgg cgggccgaag  
1921 agagtggcca cgtggtactg cgctggctcc cgcgcctgg ggcaccatg gcgagcctta  
1981 tccgctatga ggtgaacatc tcgacagaga acgcccaggg gggcgtgcag agggtgaggc  
2041 ccgcccctat ctctagccc caagggctgc acagtcaata gcaccacact ctaagtccca  
2101 cccagacggg cactatggcc tcgcccctcc acattccgcc caagacagtt ccacatctac  
2161 caacttgttc tctttcctaa tttccccttt cccacccac ctggacgcaa tcccactac  
2221 ccccttgctc caaacctag gctcctcag ggtcccgtcc tttcactgcg ctggccagtc  
2281 tgtaaataag cccaagtccg cctctgcta cctgggtccc gttctgattg gtcccagctt  
2341 tcccaggccc cgcctcctgc tttcattgcc tacctcccca agagtgggct cggttcgtcc  
2401 tttctctgat tggcttggtc catcaggccc ccccccaac atgcccttct tggcccggcc  
2461 cgcctctatt gaccacgcct ctcatccggg ccccgcccc aggtggaat cctcgacggc  
2521 cgcactgagt gcgtgctgag caacctgcgg ggtggaacgc gctacacctt catggtacgc  
2581 gcgcgaatgg cagagccgag cttcgggtggc ttctggagcg cctggtccga gcctgcgtcg  
2641 ctgctgacag ctagtgggta ggctcaggc aggggtgtag gaggtgatgg gcgaagcatg  
2701 aggcaagctc acgccttcat ctctcctgctc ccagacttg gaccccctca tctgaccct  
2761 ctccctcatc ctgcgtgctca tcttgcctgct gctggccgtg ctgcacctgc tctcccaccg  
2821 tcggtgagcg cccattctg gcacctggct cacacttttc cccaccaact tcccccttc  
2881 cctgaggaaa ctaggttcag agaggggag gcacttgctc aaagtacac agtgaggagt  
2941 cagtggcagg gctgggatgc aagccaggtc agttctagac tttcagttaa aattctcagt  
3001 tcttggcgt atttctacct tctacttcag tggcaccct tcttgattc ctttgtaat

3061 atctttccca atttcatcag ctctattgta aaatcaacca gatgagctta atggaatgat  
3121 ttaaccctaa gagcctctga ctctgttat caagatcctc ggggtgcttta tatgacaaac  
3181 atcctgaggt ttttataatt ccaagtatat accatgtggg ttcatacccc caaatcttgg  
3241 cacatactgt tcctttctacc tagaatgtcc ttcttgccat gcaatctcct atttctctta  
3301 caagtttatt tacttgattg gaaaatacat attgagtgtc aactatgtgc taggcacttg  
3361 ggagaaaatg tagaacaacac cagacatgtc tctgacctg tgaatctcat agttgagtca  
3421 tacaacaaat aagggaaatga acagatattt ggttataagt tgtgacgagt aatggtacag  
3481 aaaaaaaagg ggtatagggg cacagcagga tggccagggg aggcctcaaa gcagagagct  
3541 gaagcctgga aggaggcaga cttttgaaaa gcagggagga aaaacacgaa gtacaaaaggc  
3601 cctgagctgg gaatgagttt ggaacactga agcagctgca gaaagagcat atgggagttc  
3661 ccgttgtggc tcagtgggct aagaacccaa cacagtatcc ctaagggtc aggttcaatc  
3721 cctggcctcg ctaagtgggt taaggatctg gggttaccac aagctgcagc ataggtcaca  
3781 gatgcagctc agatctagca ttgctgtggc tgtggtgtag gctggcagct gcagctctga  
3841 tttgaccctc agccaaaaga gctgtatggg tcgaactgtg agggaggaaa tggtagatga  
3901 tgaggtaagg ggcggtgaca agagtcagat cacacagggg ccgctgcaga gctgtgggaa  
3961 ggagtgtgga ttttattctg aatgcaaggg ggtaccatgg aagggagtga ggaaggaagg  
4021 tacctaacag atatccaggc aggcctgggt gggttttaga gggagtacaa ggcagtatac  
4081 attgaacacc tatacatccc cgtcagaact ttgttctagt tgcccttttg tagggcctg  
4141 cagatgcttt ggttgagcct ctgttctcca gccccatgca ctctctctgccc tccatcatga  
4201 ccacacgagg ctaggagaat ctgtgccaac tgggtgctgag ggggtcttgg tgaatgtcca  
4261 gtgacacatg ctaggtactt ttcttttggc ttcaccagga ctctgaagca gaagatctgg  
4321 cctggtatcc caagccctga gggcgagttt gagggctctc tcaccaccca caagggtaat  
4381 ttccaggtag gtggcctggc tgtcttgtca aggcctgggg ctcccctgct cctgtggcca  
4441 atccccaggt ctctgagcag actggtgctg tttccccagc tgtggctgta ccaaactgat  
4501 ggatgtttgt ggtggagccc ctgcaccctc tttgcagagg acccacctgc ccctctggaa  
4561 gttctctctg agcgtgctg ggggggtgaca caagcagtg aaccagccgc agatgatgag  
4621 gggtcctctg tggagccggt gggcagtgaa catgcccag acacctacct ggtgctggac  
4681 aagtggttgc tgccccggag gccggccagt gaggacctcc cacagcctgg tggtgatttg  
4741 gacatggcgg ccatggatga agcctcagaa gcaccttct gctcatctgc tctggccctg  
4801 aagcctgggc cagagggggc ctgagctgcc agctttgagt atactatcct ggatcccagc  
4861 tcacagctcc tgcgccaag agccctgcc gctgagctac cccctacccc accccacctg  
4921 aagtacttgt accttgtggg gtctgactct ggcactctca ctgactacag ctgagggggc  
4981 tcccaggaaa cccagggggg ctcatccagt ggcccctact ccaaccctta tgagaacagc  
5041 cttgtcccag cccctgagcc ttcacccccg aactatgtga cctgctcata ggattccagc  
5101 cctcagatgc ttggggaccc agcatgactt caagtgtac tccaagcca acatttatcc  
5161 agcagggctc gtgaggcctc cctcaggact aaggacattg ctgaccttga ctttctgctc  
5221 aatacatcct gctcagaaag tcaca

**Promotorsequenz von Erythropoetin aus BAC CH242-137H (GenBank Acc. No.****FP326674.2)**

46741            tac ctctgtccac acccaccatc cccatgacct tttctagcga ggcgctcgcg  
 46801 ggggcagcta cactaccaga gacaaggtga acacatgccc agcttcccag aaggaacagt  
 46861 ggaggacact ggaggaagct gaggaatata ctggagagtt ggtctccagg actcccacgt  
 46921 gaggacaaac agcagggaga gtgaagtgag ggcgcagtga tgaccgctgg cctttaccaa  
 46981 ttactccgtg ctggccagca tgtaatocca ggacagtcct ggcaagtgac tgctatcatt  
 47041 tttgccatcc ccaggctcag agataaagtc acttgtctaa gtcagggtgct tggtaagtgg  
 47101 cagagttcag gccgctaate cgggctgcct tgtttaccgg acaacccttg tcaggctgct  
 47161 gaagcacaga gctgctacta agaatagaaa cccaggggtc tggttcactg cttactctgt  
 47221 ggccaagaaa gcagaacttg cctcagtttc tccaaactga cctttgcaca ggactttctt  
 47281 tggttgtcca gcaggaatcc cttctccaga gtccgtgctc cttccctgt tcccaaggg  
 47341 ccaggaagcc ctcccccaa cgccctctga ggtccccagc cggccacctc gcttcccagc  
 47401 acagaaggtc ttccgggcct ctggctgaat tcccgaggcc cagaagagaa gccactgctt  
 47461 ggaaaggagg aggaggagag gtctggaggt ccctctcgtc cccagcacia ctccaggcag  
 47521 ctgggacttc atgctgcctg ggggtctgga cagccccggg ggatgggggg ctgtaaatct  
 47581 gcttcttggc tttttcaate tgaactggct gccaggaaga ctccaggga cagagcctgc  
 47641 ctccaccccc gccatcctct ggtcacaacc gtcccttttc agaccctgcc tcagcagctg  
 47701 cctgctcaag aagtagatgg tggcgtctca agccccctcg attccagagg gaggttgtcc  
 47761 cggcctggct ccagcacgca ttccggaggct gagcagctca ctctctcct cgagacctcc  
 47821 ggtttctctg gccaaagtgc ctggagtgga gggagcacgt aatgcaagcc acacgcaagc  
 47881 catgaccaca cagaggcaac atgctaggtg cccaatggca ccaaggtgaa caagatctgc  
 47941 cgcacacggt cctttgctct cttctctgat taacctgtgc tgctgactc cagagggtag  
 48001 cattctcctc agggctctaca tgagtggcac ttcttggagc tgggtcctga accttgtcag  
 48061 ttgtacatgg tggctctgggc aggagagacc taagacacat acataaagga tggcagctga  
 48121 gatggggaag acagctttct actcgggtgt cagggagggc ttcacagaga aggtaatgct  
 48181 tgggtggagg cttgaaggac agggagagat agtgtgggag ggagatccag gtggatgaca  
 48241 cagagtgagc aaagggcagg aagcagcaaa ccatccaact aagtccatgt gaggggggag  
 48301 tgggaacgag ccaagtggga gaacaggctg tagaggcagg tggatggcag cacacaaagg  
 48361 gtcttcgctc agagggcact gggagccact gcaggctcct gctcagggga ctgataggaa  
 48421 caaggccact gaatgagaaa gttactctag tgacacagct ggggattcac ctggggggaa  
 48481 gagacagtga ggagaccctc tgcagtggtc ctggcgtggt gccagcacta cgccagagaa  
 48541 atgcaaacag gcagatggag ggggcactgg taggggttga tgggtatcag agggagagcc  
 48601 ccagatagct tctgctctt cagggccccc tgctgtcaag gatggataga tggacctgctc  
 48661 tgggcagtat ccaagagcac ctgtgctgaa gctggccccc aaaccagcct ctgcaccctg  
 48721 agtggagtta cgacagctca gggattgggt gcagggtgta ctgagatact gtcctctatt  
 48781 ccctctccca ggctgcaatt gtagctctct ccaaaagccc caggagatga gccaggacga  
 48841 ctctgtcagc agtccccagc acctaggggc tagtgctcag ggcccatctc ccttcttttc  
 48901 tcaaaggcag gggcctaggg acctctgaca agttgctgtc aggagagaaag caggtcccac  
 48961 agcctgaatg actcttctct tctctctct cctctggctg cgtctacctc cccatctgtt  
 49021 cctggccccc tctccatggt caggtcaggg cagtgcgca ggagtcagga gactgggaga

---

49081 gcagagcctg gggggtgtgg gggagtcggg acagaatgca tgtgtggacg tgtgtggacg  
49141 tgagtgtgcg tgtgctcgtc ccacagctgg gatctgggaa gggagcagaa ttgggctttg  
49201 agggccaagt gaggctggga ggctgcctgg gtgctgagag ggaaactggg accagagggc  
49261 ataatggggt gtgcagacca gcagccagta caccacgttc aagggggggcc cccagagcag  
49321 gatcaaggtg agcagagggc aggggagcag ggtccgagca agtcagaccc ttattatttc  
49381 ctattacttc cccaaagctt ctgtctccct gcccttcccg ttcattcttc tgaaccctc  
49441 tttgagaatg ccctttcccc aaccagttac tcatggctcc ctccatcatc ttctcaacag  
49501 gcatcccttc ctgattcatt taacactgcc ccctccttca aactcccgg gccttttctc  
49561 tttagtcttc tttgccatta gagatcctcc atcttttatt cttttttgtg tttatcatcc  
49621 atctctccac tagaatgtca gttccaccag gcaaggccag atcctaaact ggctgaacca  
49681 caaaagaact cctggtaagc attcttgtct gcttcaatca ctgctccaac cccaggtccc  
49741 tggccaagag taggtactct tacatgtgta tttctttttt aaaatttatt ttatttttag  
49801 gggagttcct gtcgcaacac agcagaaaca aatctcacta ggaaccatga gattgctggg  
49861 tcaatccctg gcctcactca gtgggttcag gatccgggtg tgccatgagc tgtggggtag  
49921 gctgaagaca cggctcagat cccacgctgc tgtggctgtg gtggaggctg gcagcaacaa  
49981 ctccgattag actcctagcc tgggaacctc catatgctgt ggggtcggcc ctaaaaaaga  
50041 caaaagacaa aaaaaatta ttttattttt agggctgcac ctgcagcata tggagttcc  
50101 taggctaggg gatgaatcag agctgcagct gtcattctatg tcacagcttt cggcaacaca  
50161 gtatccttaa cccactgagt gaggccaggg atcaaacctg catcctcatg gataactaatt  
50221 gggttcataa cccgctcagc cataacagga acgcccacat gtatatcttct tgagtgagtg  
50281 aatgactatt tcccactctt tccaaacaaa atccaaattc ttcagagcgg cattcacggc  
50341 cctttgcagc ctgacccttc cctaacagta ctctagcccc atctccacct ctctcccac  
50401 agcctccacc ccaactaggc aatggaccaa cctccccac ccacctcaca tctcttcca  
50461 ttgaaatctt acccaccctt caaggctgag cttgttgta cctcctgtat caaatctccc  
50521 ttgattccct ctgctggaag tgagctcccc tcttccaaac tcttacagct cagatctgta  
50581 cacctcagtc ctccaggccc catggacccc ccccttctct ctactgtaag ctacaaaactt  
50641 caggaggcag gaggcaggaa gcagggttca acacatcttt tggctctgaa aattttgtag  
50701 tcaattgtct tgcactaaga agacactgaa tgcatgaata aggtatctct aatatcatgg  
50761 gactggggag ggagtgaatg tataaatatc cacctgtatt tgtaggactt ccctgccttt  
50821 tttttttttt tttttttttt tttggctgtg cctaaagcat acaaaagttt ccagaccagg  
50881 taggtattta acctgcacca cagcagtgcac aactagat cctcaacccc atgtgccacc  
50941 aaggaattcc agacttccct gacttttttt ttcttttggg ctttttaggg ccacacttgt  
51001 ggcataatgga agttcccagg ctagggttga atcagagctg cagctgccag cctatgccac  
51061 agccacagga atgcgggatc cgagctgcat ctgtgatctt catcacagct catagcaaaa  
51121 tcggatcctt aaccactga aaggggocag ggattgaacc tttgtcctca cagatactag  
51181 ttgagttcgt tactcctgag ccacagtgcac gacttctccg tcttttatga gaactgcatg  
51241 agctgggact ggtgttttca tgacacctt ttcacagatg agagcactga ggttcagggg  
51301 ctcagactca ctcttttcca aggtttgaga ggctagctag ccttgattc ctgctcccca  
51361 gacctgaacc cctgcctcag ggcttcccag aagccacaaa atttagctgc aaattctaag  
51421 tgccctcact ctgggggtta gctctatact agagctctta aagaattttg tgggagttac  
51481 catcatggct cagcagaatc gagtctgact agcatccatg aggatgcagg ttcgatccct

51541 ggtcctgctc agtgggttaa ggatccagtg ttgccatgag ctgtggagta ggtcagagat  
 51601 gtggcttggg gaggccctaa aaagaccccc cccaaaaaaa gaattttgtc acacagatta  
 51661 gcctaaaagt tcagtatctg gcttttcagg gtccctagaag ggggggagaa gaccccccaa  
 51721 atttcttgct ctgtgcggcc cccactaaat tcctcaacaa aacgacacta gtttctagaa  
 51781 caagaactgg gatthttgagg aggccactgg tgtgccccac cagcaccttt tcggcttcca  
 51841 caccagatg ccttgcagtc ccagctctga gtctccgccc aagatgggga caccctctc  
 51901 tccagagggc cgtcgggggc accagtcttt ccagaatgg cactgctttc ccagcgcagc  
 51961 cttctgcca tccagctgag agcaccacc tgcacctca ggaactcagg gatcggggcg  
 52021 gtagccccgt gccccgcacc cgcgcccgt ggtctcactc ccctgagggc ccccgaccca  
 52081 ggcgtcctgc cccggtctg acccctcgg cccacacctc ccgagacccc tcacgcacac  
 52141 agcctcccc caacccccca cacgcacgca cacagctgat aacagccccg accccggcc  
 52201 gccgcccag tccccgggc aacccggcc cgtcgcctcg cctcgcgctc ctccggacc  
 52261 tggctggggg ccctgaggcg ctctgttccg accccgcctc ggggggtccc gacagcagcc  
 52321 ccctcct

**Promotorsequenz von Erythropoetin Rezeptor aus BAC CH242-272A5 (GenBank Acc. No. CU85518.2)**

36343 agaagtcc acattagctt  
 36361 catcatcaca cagtttctcc cctcctagtg acaaagatgt ctttggctac tccacctgca  
 36421 tccctcatca cccaatagaa agcagcacct cttttccta ggaactcaag gaaaaggctc  
 36481 aggatggaag cctattgggt ccccttgtgt tacatgctct ccctgaacca atcactgtgt  
 36541 tccagggaat ggagctttct gattggctaa tctatggcag gctgatgcaa taaggtaagt  
 36601 accactctc cccagggcag gtaacctctgt ctcggggggt ttacctcagt ttaagcttag  
 36661 ctcaagggaa tagcttttat ggtttgttct atactttcaa gattattaaa gaactgcaca  
 36721 ctcttctgtag aataaaatcc caagagtgt caaacataag cgttaaaagt ctttttcaa  
 36781 aaaaatcaca aatgaaatct cacactccag aatacatgta attttacaaa cacaagctca  
 36841 ttcattgatg ctgtctggca gcactgccc acagtgtgca aacactcaaa tgtgcctcat  
 36901 tattacaatt atttttttcc tcctcagacg gggaagagat gttgattagt atgataatat  
 36961 cagtagctta cgttttcgga atgtttgcta tgtgccaagc caggttttat agatgagaag  
 37021 gctaaagacc agataatgta agtcacctgt ccaggatcac acagcaaaga aagtgtgtcc  
 37081 atgcagaaac cagagctctt cccacccccca cccgcaagga gccacggggg ctctggaggg  
 37141 cccctgccct ctccaggccc agcagggcgt ctgcctctct cttatctcag ccctggctgc  
 37201 ctgctagtcc cgccccctcg ggggagctgc cacttggagg cgcctggccg

---

**3'UTR Region von Erythropoetin Rezeptor aus BAC CH242-272A5 (GenBank Acc. No. CU855518.2)**

42121 accccacctg aagtacttgt accttgtggt gtctgactct ggcatctcaa ctgactacag  
42181 ctcagggggc tcccaggaaa cccagggggg ctcatccagt ggcccctact ccaaccctta  
42241 tgagaacagc cttgtcccag cccctgagcc ttcacccccg aactatgtga cctgctcata  
42301 ggattccagc cctcagatgc ttggggacc agcatgactt caagtgctac tccaagccca  
42361 acatttatcc agcaggggtca gtgaggcctc cctcaggaca aaggacattg ctgaccttga  
42421 ctttctgctc aatacatcct gctcagaaaag tcacaacctt acagtatttt taatgtacag  
42481 ggtttttttt gtagagatat atatataaat atatataaat ttttgtcatg acttctgtaa  
42541 atacctgtaa gttcatcctt ttccctgggc cataggagca gcagtataag gtcttgagtt  
42601 cagtctgaaa ttgtgacctg actgaataat aataataaaa tgaatcagtc agtgtaagtt  
42661 atgctagctg ccctaacaaa caactcctgg gagttgcctt gtggtacagt gggttaagga  
42721 tccagaattg tcaactgaagt ggctcaggtc gctgctgtgg catgggtgtg atccctggcc  
42781 tgggagttgc ttaacacatt aaatgttttc tctctcatat ttcaatttaa acaggtgggc  
42841 agctatcctt gggatacatc agaatcccag actggcttta tcatccccag gggtaacttg  
42901 gcatctttag atgaatcctc tgcatcctgt cagccaacaa gcaaagacag taggtgattc  
42961 tgtgagctat tttagggatc tagcctagag gtgttgcca tctcttctc acaaatctta  
43021 ccagtcagaa atgggtcatgc aatcaccgcc agaacgattg acagctggga aatgtagttt  
43081 agctgtgcat ccagaagaga aaagctgttt aatgagccac tagctagtct ctgctactat  
43141 taatagcaat attcattcct aaggcttcat tttcaatcag gccagttct aagaaagcac  
43201 tgtgatgaca ccaaagtca tcaagagact caatgggagt tctgggtctcg ccacttttaa  
43261 aaagttcgac ataggagttc cagttgtggc tcagcgggtt aagaactgac tagtatccat  
43321 aaggatgcag gtttgatccc tggccatact cagtgggtta aggatccagc attggcaaga  
43381 gctctgggtg acgtcccaga cagagctcag atctgggtgtt gctgtgactg tgggtcaggc  
43441 ctgcagctgc agctccaatt tgacctctac tctgggaact tccatatgcc gcaggtacag  
43501 cactaaaaag acaataaat aaataaagtt tggcataatc taggaaagct gggagttccc  
43561 gtcattggcac agtgggttaac gaatccgacc aggaaccatg aggttgccggg ttcggtcctc  
43621 gcccttgctc agtgggttaa cgatccagca ttgccgtgag ctgtgggtgta ggtcgcagac  
43681 tcggctcaga tcctgttgc tgtggctctg gtgtaggccg gcggctacag ctccgatttg  
43741 acctctagcc tgggaacctg tatatgccg

**Buchstabencode für Aminosäuren**

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Assoziation von EP9\_3 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC der F2-Generation

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	14	8.14	0.48	0.13	7.87	8.42	7.3	8.8	1.5
	2	51	8.11	0.65	0.09	7.92	8.29	6.1	9.5	3.4
	3	50	8.07	0.46	0.07	7.94	8.21	6.8	9	2.2
	Gesamt	115	8.1	0.55	0.05	7.99	8.2	6.1	9.5	3.4
hb14	1	15	8.44	0.84	0.22	7.98	8.9	6.6	9.6	3
	2	53	8.38	0.86	0.12	8.14	8.62	5.7	10.3	4.6
	3	51	8.25	0.72	0.1	8.05	8.45	6.3	9.9	3.6
	Gesamt	119	8.33	0.8	0.07	8.19	8.48	5.7	10.3	4.6
hb28	1	15	8.46	0.52	0.13	8.17	8.75	7.7	9.3	1.6
	2	53	8.15	0.62	0.09	7.98	8.32	6.4	9.6	3.2
	3	48	8.05	0.55	0.08	7.89	8.21	6.6	9.2	2.6
	Gesamt	116	8.15	0.59	0.05	8.04	8.26	6.4	9.6	3.2
hb42	1	15	8.93	0.9	0.23	8.43	9.42	6.8	10.5	3.7
	2	52	8.66	0.78	0.11	8.44	8.87	5.8	10.5	4.7
	3	49	8.74	0.65	0.09	8.55	8.93	7	10.4	3.4
	Gesamt	116	8.73	0.74	0.07	8.59	8.86	5.8	10.5	4.7
ery0	1	14	6.94	0.59	0.16	6.6	7.27	6.14	8.13	1.99
	2	51	6.95	0.6	0.08	6.78	7.12	5.28	8.36	3.08
	3	50	6.81	0.5	0.07	6.67	6.96	5.75	8.27	2.52
	Gesamt	115	6.89	0.55	0.05	6.79	6.99	5.28	8.36	3.08
ery14	1	15	7.32	0.56	0.15	7	7.63	6.44	8.04	1.6
	2	53	7.19	0.83	0.11	6.96	7.42	5.49	9.63	4.14
	3	51	7.05	0.63	0.09	6.87	7.23	5.62	8.08	2.46
	Gesamt	119	7.15	0.72	0.07	7.01	7.28	5.49	9.63	4.14
ery28	1	15	7.31	0.51	0.13	7.03	7.59	6.06	7.89	1.83
	2	53	7.02	0.66	0.09	6.84	7.2	5.89	8.95	3.06
	3	48	6.84	0.61	0.09	6.66	7.01	5.38	8.75	3.37
	Gesamt	116	6.98	0.63	0.06	6.87	7.1	5.38	8.95	3.57
ery42	1	15	7.64	0.74	0.19	7.23	8.05	6.4	9.2	2.8
	2	52	7.4	0.75	0.1	7.19	7.61	6.2	9.3	3.1
	3	49	7.35	0.68	0.1	7.15	7.54	6	9.1	3.1
	Gesamt	116	7.41	0.72	0.07	7.28	7.54	6	9.3	3.3
htk0	1	14	0.39	0.02	0.01	0.37	0.4	0.35	0.43	0.08
	2	51	0.39	0.03	0	0.38	0.39	0.3	0.46	0.16
	3	50	0.38	0.02	0	0.38	0.39	0.34	0.44	0.1
	Gesamt	115	0.39	0.03	0	0.38	0.39	0.3	0.46	0.16
htk14	1	15	0.4	0.04	0.01	0.38	0.42	0.33	0.46	0.13
	2	53	0.39	0.04	0.01	0.38	0.4	0.28	0.48	0.2
	3	51	0.39	0.03	0	0.38	0.4	0.31	0.46	0.15
	Gesamt	119	0.39	0.04	0	0.39	0.4	0.28	0.48	0.2
htk28	1	15	0.41	0.02	0.01	0.39	0.42	0.37	0.46	0.09
	2	53	0.39	0.03	0	0.38	0.4	0.31	0.45	0.14
	3	48	0.39	0.03	0	0.38	0.39	0.32	0.43	0.11
	Gesamt	116	0.39	0.03	0	0.39	0.4	0.31	0.46	0.15
htk42	1	15	0.43	0.04	0.01	0.41	0.45	0.36	0.5	0.14
	2	52	0.41	0.04	0.01	0.4	0.42	0.3	0.5	0.2
	3	49	0.42	0.04	0.01	0.41	0.43	0.33	0.51	0.18
	Gesamt	116	0.41	0.04	0	0.41	0.42	0.3	0.51	0.21
mchc0	1	14	21.11	0.57	0.15	20.78	21.44	20	22.1	2.1
	2	51	21.09	0.55	0.08	20.94	21.25	20.2	22.4	2.2
	3	50	21.02	0.66	0.09	20.84	21.21	19.8	23.6	3.8
	Gesamt	115	21.06	0.6	0.06	20.95	21.17	19.8	23.6	3.8
mchc14	1	15	21.33	0.49	0.13	21.06	21.6	21	22	1
	2	53	21.36	0.74	0.1	21.16	21.56	19	24	5
	3	51	21.31	1.41	0.2	20.92	21.71	20	30	10
	Gesamt	119	21.34	1.05	0.1	21.15	21.53	19	30	11
mchc28	1	15	20.88	0.66	0.17	20.51	21.25	19.7	22.2	2.5
	2	53	20.84	0.57	0.08	20.69	21	19.6	22.3	2.7
	3	48	21	1.31	0.19	20.62	21.38	19.6	28.6	9
	Gesamt	116	20.91	0.95	0.09	20.74	21.09	19.6	28.6	9
mchc42	1	15	20.99	0.72	0.19	20.59	21.39	19.4	22.3	2.9
	2	52	21.31	0.49	0.07	21.17	21.44	19.9	22.3	2.4
	3	49	21.1	0.7	0.1	20.9	21.3	19.4	22.2	2.8
	Gesamt	116	21.18	0.62	0.06	21.07	21.29	19.4	22.3	2.9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk:Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N: Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: AA , 2: AG, 3: GG

## Assoziation von EP3 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC der F2-Generation

	Genotvp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	9	8,12	0,54	0,18	7,71	8,54	7,3	8,8	1,5
	2	38	8,14	0,59	0,1	7,95	8,34	6,5	9,5	3
	3	37	8,02	0,44	0,07	7,87	8,17	7,1	9	1,9
	4	1	7,9					7,9	7,9	0
	Gesamt	85	8,08	0,51	0,06	7,97	8,2	6,5	9,5	3
hb14	1	10	8,27	0,9	0,28	7,63	8,91	6,6	9,6	3
	2	40	8,46	0,87	0,14	8,18	8,74	5,7	10,3	4,6
	3	38	8,29	0,7	0,11	8,06	8,52	6,7	9,9	3,2
	4	1	8,2					8,2	8,2	0
	Gesamt	89	8,36	0,8	0,08	8,19	8,53	5,7	10,3	4,6
hb28	1	10	8,56	0,63	0,2	8,11	9,01	7,7	9,3	1,6
	2	40	8,21	0,58	0,09	8,02	8,39	6,6	9,6	3
	3	36	8,11	0,51	0,08	7,93	8,28	7	9,2	2,2
	4	1	7,7					7,7	7,7	0
	Gesamt	87	8,2	0,57	0,06	8,08	8,32	6,6	9,6	3
hb42	1	10	8,91	1,07	0,34	8,15	9,67	6,8	10,5	3,7
	2	39	8,73	0,85	0,14	8,45	9	5,8	10,5	4,7
	3	37	8,72	0,64	0,1	8,5	8,93	7	10,4	3,4
	4	1	8,8					8,8	8,8	0
	Gesamt	87	8,74	0,78	0,08	8,58	8,91	5,8	10,5	4,7
ery0	1	9	6,96	0,67	0,22	6,44	7,47	6,24	8,13	1,89
	2	38	6,96	0,58	0,09	6,77	7,15	5,81	8,36	2,55
	3	37	6,76	0,45	0,07	6,61	6,91	5,75	7,8	2,05
	4	1	6,62					6,62	6,62	0
	Gesamt	85	6,87	0,54	0,06	6,75	6,99	5,75	8,36	2,61
ery14	1	10	7,2	0,61	0,19	6,76	7,63	6,44	7,93	1,49
	2	40	7,24	0,81	0,13	6,98	7,49	5,49	9,58	4,09
	3	38	7,08	0,59	0,1	6,89	7,28	5,82	8,08	2,26
	4	1	6,8					6,8	6,8	0
	Gesamt	89	7,16	0,69	0,07	7,02	7,31	5,49	9,58	4,09
ery28	1	10	7,43	0,67	0,21	6,96	7,91	6,06	8,41	2,35
	2	40	7,02	0,61	0,1	6,82	7,21	5,93	8,95	3,02
	3	36	6,88	0,61	0,1	6,68	7,09	5,38	8,75	3,37
	4	1	6,63					6,63	6,63	0
	Gesamt	87	7,01	0,63	0,07	6,87	7,14	5,38	8,95	3,57
ery42	1	10	7,67	0,93	0,29	7	8,34	6,4	9,2	2,8
	2	39	7,4	0,8	0,13	7,14	7,66	6,2	9,3	3,1
	3	37	7,34	0,64	0,11	7,12	7,55	6	9,1	3,1
	4	1	7,5					7,5	7,5	0
	Gesamt	87	7,41	0,75	0,08	7,25	7,57	6	9,3	3,3
htk0	1	9	0,39	0,02	0,01	0,37	0,4	0,35	0,42	0,07
	2	38	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,32	0,46	0,14
	3	37	0,38	0,02	0	0,37	0,39	0,34	0,43	0,09
	4	1	0,37					0,37	0,37	0
	Gesamt	85	0,38	0,03	0	0,38	0,39	0,32	0,46	0,14
htk14	1	10	0,39	0,04	0,01	0,36	0,42	0,33	0,46	0,13
	2	40	0,4	0,04	0,01	0,39	0,41	0,28	0,48	0,2
	3	38	0,39	0,03	0,01	0,38	0,4	0,32	0,46	0,14
	4	1	0,38					0,38	0,38	0
	Gesamt	89	0,39	0,04	0	0,39	0,4	0,28	0,48	0,2
htk28	1	10	0,41	0,03	0,01	0,39	0,43	0,37	0,46	0,09
	2	40	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,33	0,45	0,12
	3	36	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,33	0,43	0,1
	4	1	0,36					0,36	0,36	0
	Gesamt	87	0,39	0,03	0	0,39	0,4	0,33	0,46	0,13
htk42	1	10	0,43	0,04	0,01	0,4	0,46	0,36	0,5	0,14
	2	39	0,41	0,04	0,01	0,4	0,43	0,3	0,51	0,21
	3	37	0,41	0,03	0,01	0,4	0,43	0,33	0,49	0,16
	4	1	0,4					0,4	0,4	0
	Gesamt	87	0,42	0,04	0	0,41	0,42	0,3	0,51	0,21
mchc0	1	9	21,06	0,45	0,15	20,71	21,4	20,5	21,8	1,3
	2	38	21,12	0,6	0,1	20,93	21,32	20,2	22,4	2,2
	3	37	21,09	0,67	0,11	20,87	21,31	19,8	23,6	3,8
	4	1	21,1					21,1	21,1	0
	Gesamt	85	21,1	0,61	0,07	20,97	21,23	19,8	23,6	3,8
mchc14	1	10	21,3	0,67	0,21	20,82	21,78	20	22	2
	2	40	21,28	0,75	0,12	21,04	21,52	19	24	5
	3	38	21,4	1,57	0,25	20,88	21,91	20	30	10
	4	1	21					21	21	0
	Gesamt	89	21,33	1,16	0,12	21,08	21,57	19	30	11
mchc28	1	10	20,82	0,8	0,25	20,25	21,39	19,7	22,2	2,5
	2	40	20,82	0,59	0,09	20,63	21,01	19,6	22,3	2,7
	3	36	21,05	1,49	0,25	20,54	21,56	19,6	28,6	9
	4	1	21,3					21,3	21,3	0
	Gesamt	87	20,92	1,07	0,11	20,69	21,15	19,6	28,6	9
mchc42	1	10	20,88	0,81	0,26	20,3	21,46	19,4	22,3	2,9
	2	39	21,22	0,56	0,09	21,03	21,4	19,7	22,3	2,6
	3	37	21,12	0,62	0,1	20,92	21,33	19,4	22,2	2,8
	4	1	21,8					21,8	21,8	0
	Gesamt	87	21,14	0,62	0,07	21,01	21,28	19,4	22,3	2,9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk:Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N: Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: GGCTCAG/GGCTCAG, 2: GGCTCAG/CAG, 3:CAG/CAG, 4: GGCCAG/GGCCAG

## Assoziation von EP3\_1 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC der F2-Generation

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	2	59	8.07	0.58	0.07	7.92	8.22	6.5	9.5	3
	3	7	7.83	0.91	0.34	6.99	8.67	6.1	9	2.9
	Gesamt	66	8.05	0.61	0.08	7.9	8.2	6.1	9.5	3.4
hb14	2	63	8.33	0.89	0.11	8.11	8.55	5.7	10.3	4.6
	3	7	8.26	0.65	0.24	7.66	8.85	6.9	8.9	2
	Gesamt	70	8.32	0.86	0.1	8.12	8.53	5.7	10.3	4.6
hb28	2	63	8.18	0.6	0.08	8.03	8.34	6.6	9.6	3
	3	7	8.1	0.73	0.27	7.43	8.77	7.2	9	1.8
	Gesamt	70	8.18	0.61	0.07	8.03	8.32	6.6	9.6	3
hb42	2	62	8.68	0.85	0.11	8.47	8.9	5.8	10.5	4.7
	3	7	8.4	0.55	0.21	7.89	8.91	7.4	9.1	1.7
	Gesamt	69	8.66	0.82	0.1	8.46	8.85	5.8	10.5	4.7
ery0	2	59	6.86	0.55	0.07	6.72	7.01	5.81	8.36	2.55
	3	7	6.75	0.69	0.26	6.11	7.38	5.28	7.35	2.07
	Gesamt	66	6.85	0.56	0.07	6.71	6.99	5.28	8.36	3.08
ery14	2	63	7.14	0.74	0.09	6.95	7.32	5.49	9.58	4.09
	3	7	7.13	0.73	0.28	6.45	7.8	5.63	7.91	2.28
	Gesamt	70	7.14	0.73	0.09	6.96	7.31	5.49	9.58	4.09
ery28	2	63	7	0.6	0.08	6.85	7.15	5.75	8.95	3.2
	3	7	6.95	0.73	0.28	6.27	7.62	5.92	7.93	2.01
	Gesamt	70	7	0.61	0.07	6.85	7.14	5.75	8.95	3.2
ery42	2	62	7.39	0.75	0.1	7.2	7.59	6.2	9.3	3.1
	3	7	7.1	0.52	0.2	6.62	7.58	6.2	7.7	1.5
	Gesamt	69	7.36	0.74	0.09	7.19	7.54	6.2	9.3	3.1
htk0	2	59	0.38	0.03	0	0.38	0.39	0.32	0.46	0.14
	3	7	0.37	0.03	0.01	0.34	0.4	0.3	0.41	0.11
	Gesamt	66	0.38	0.03	0	0.37	0.39	0.3	0.46	0.16
htk14	2	63	0.39	0.04	0	0.38	0.4	0.28	0.48	0.2
	3	7	0.38	0.03	0.01	0.35	0.41	0.32	0.41	0.09
	Gesamt	70	0.39	0.04	0	0.38	0.4	0.28	0.48	0.2
htk28	2	63	0.39	0.03	0	0.38	0.4	0.33	0.46	0.13
	3	7	0.39	0.03	0.01	0.35	0.42	0.34	0.43	0.09
	Gesamt	70	0.39	0.03	0	0.38	0.4	0.33	0.46	0.13
htk42	2	62	0.41	0.04	0.01	0.4	0.42	0.3	0.51	0.21
	3	7	0.39	0.03	0.01	0.37	0.42	0.35	0.42	0.07
	Gesamt	69	0.41	0.04	0	0.4	0.42	0.3	0.51	0.21
mchc0	2	59	21.14	0.65	0.08	20.97	21.31	20	23.6	3.6
	3	7	21.4	0.54	0.2	20.9	21.9	20.7	22.2	1.5
	Gesamt	66	21.17	0.64	0.08	21.01	21.32	20	23.6	3.6
mchc14	2	63	21.22	0.73	0.09	21.04	21.41	19	24	5
	3	7	21.71	0.76	0.29	21.02	22.41	21	23	2
	Gesamt	70	21.27	0.74	0.09	21.1	21.45	19	24	5
mchc28	2	63	20.85	0.68	0.09	20.68	21.02	19.6	22.9	3.3
	3	7	21	0.72	0.27	20.34	21.66	19.8	21.8	2
	Gesamt	70	20.86	0.68	0.08	20.7	21.02	19.6	22.9	3.3
mchc42	2	62	21.12	0.66	0.08	20.96	21.29	19.4	22.3	2.9
	3	7	21.54	0.4	0.15	21.17	21.92	21.1	22.2	1.1
	Gesamt	69	21.17	0.65	0.08	21.01	21.32	19.4	22.3	2.9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk: Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N: Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 2: CT, 3: TT

## Assoziation von EE1b mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC der F2-Generation

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	35	8,04	0,47	0,08	7,88	8,2	7,1	9	1,9
	2	29	8,19	0,49	0,09	8	8,37	7,5	9,2	1,7
	3	10	8,08	0,69	0,22	7,59	8,57	6,5	8,8	2,3
	Gesamt	74	8,1	0,51	0,06	7,98	8,22	6,5	9,2	2,7
hb14	1	36	8,27	0,66	0,11	8,04	8,49	6,7	9,9	3,2
	2	30	8,48	0,73	0,13	8,21	8,75	6,6	10,3	3,7
	3	11	8,42	1,15	0,35	7,65	9,19	5,7	9,6	3,9
	Gesamt	77	8,37	0,77	0,09	8,2	8,55	5,7	10,3	4,6
hb28	1	35	8,14	0,54	0,09	7,95	8,32	7	9,2	2,2
	2	30	8,22	0,55	0,1	8,01	8,42	7,3	9,6	2,3
	3	10	8,28	0,78	0,25	7,72	8,84	6,6	9,3	2,7
	Gesamt	75	8,19	0,58	0,07	8,06	8,32	6,6	9,6	3
hb42	1	36	8,71	0,66	0,11	8,49	8,94	7	10,4	3,4
	2	29	8,78	0,74	0,14	8,5	9,07	7,5	10,5	3
	3	10	8,76	1,22	0,39	7,89	9,63	5,8	10,5	4,7
	Gesamt	75	8,75	0,77	0,09	8,57	8,92	5,8	10,5	4,7
ery0	1	35	6,78	0,54	0,09	6,59	6,96	5,75	8,27	2,52
	2	29	7,01	0,53	0,1	6,81	7,21	6,11	8,36	2,25
	3	10	6,85	0,66	0,21	6,37	7,33	5,81	7,73	1,92
	Gesamt	74	6,88	0,56	0,06	6,75	7,01	5,75	8,36	2,61
ery14	1	36	7,02	0,63	0,11	6,81	7,23	5,57	8,06	2,49
	2	30	7,27	0,71	0,13	7,01	7,54	5,77	9,58	3,81
	3	11	7,31	0,8	0,24	6,78	7,85	5,49	8,47	2,98
	Gesamt	77	7,16	0,69	0,08	7	7,32	5,49	9,58	4,09
ery28	1	35	6,91	0,67	0,11	6,68	7,14	5,38	8,75	3,37
	2	30	6,99	0,59	0,11	6,77	7,22	6,2	8,95	2,75
	3	10	7,15	0,57	0,18	6,74	7,56	6,06	7,89	1,83
	Gesamt	75	6,97	0,63	0,07	6,83	7,12	5,38	8,95	3,57
ery42	1	36	7,31	0,7	0,12	7,07	7,55	6	9,1	3,1
	2	29	7,41	0,77	0,14	7,12	7,71	6,3	9,3	3
	3	10	7,6	0,81	0,26	7,02	8,18	6,3	9,2	2,9
	Gesamt	75	7,39	0,74	0,09	7,22	7,56	6	9,3	3,3
htk0	1	35	0,38	0,02	0	0,37	0,39	0,34	0,44	0,1
	2	29	0,39	0,03	0,01	0,38	0,4	0,34	0,46	0,12
	3	10	0,39	0,03	0,01	0,36	0,41	0,32	0,43	0,11
	Gesamt	74	0,39	0,03	0	0,38	0,39	0,32	0,46	0,14
htk14	1	36	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,32	0,45	0,13
	2	30	0,4	0,03	0,01	0,39	0,41	0,32	0,48	0,16
	3	11	0,4	0,05	0,02	0,36	0,44	0,28	0,46	0,18
	Gesamt	77	0,4	0,04	0	0,39	0,4	0,28	0,48	0,2
htk28	1	35	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,33	0,43	0,1
	2	30	0,39	0,03	0,01	0,38	0,4	0,35	0,45	0,1
	3	10	0,4	0,04	0,01	0,38	0,43	0,33	0,46	0,13
	Gesamt	75	0,39	0,03	0	0,39	0,4	0,33	0,46	0,13
htk42	1	36	0,42	0,04	0,01	0,4	0,43	0,33	0,49	0,16
	2	29	0,41	0,04	0,01	0,4	0,43	0,35	0,51	0,16
	3	10	0,42	0,06	0,02	0,38	0,46	0,3	0,5	0,2
	Gesamt	75	0,41	0,04	0	0,41	0,42	0,3	0,51	0,21
mchc0	1	35	21,07	0,7	0,12	20,83	21,31	19,8	23,6	3,8
	2	29	21,11	0,59	0,11	20,89	21,34	20,2	22,4	2,2
	3	10	20,89	0,45	0,14	20,57	21,21	20	21,4	1,4
	Gesamt	74	21,06	0,63	0,07	20,92	21,21	19,8	23,6	3,8
mchc14	1	36	21,47	1,66	0,28	20,91	22,04	20	30	10
	2	30	21,2	0,66	0,12	20,95	21,45	19	22	3
	3	11	21,18	0,4	0,12	20,91	21,45	21	22	1
	Gesamt	77	21,33	1,22	0,14	21,05	21,6	19	30	11
mchc28	1	35	20,94	1,45	0,25	20,44	21,44	19,6	28,6	9
	2	30	20,85	0,68	0,12	20,59	21,1	19,6	22,9	3,3
	3	10	20,72	0,7	0,22	20,22	21,22	20	22,2	2,2
	Gesamt	75	20,87	1,1	0,13	20,62	21,13	19,6	28,6	9
mchc42	1	36	21,1	0,62	0,1	20,89	21,31	19,4	22,2	2,8
	2	29	21,29	0,58	0,11	21,07	21,51	19,7	22,1	2,4
	3	10	20,9	0,74	0,23	20,37	21,43	19,8	22,3	2,5
	Gesamt	75	21,14	0,63	0,07	21	21,29	19,4	22,3	2,9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk: Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N: Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: DD, 2: Dd, 3: dd

## Assoziation von EE11 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHCder F2-Generation

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	34	8.05	0.45	0.08	7.9	8.21	6.8	9	2.2
	2	59	8.14	0.64	0.08	7.98	8.31	6.1	9.5	3.4
	3	22	8.04	0.44	0.09	7.84	8.24	7.3	8.8	1.5
	Gesamt	115	8.1	0.55	0.05	7.99	8.2	6.1	9.5	3.4
hb14	1	35	8.18	0.78	0.13	7.92	8.45	6.3	9.9	3.6
	2	60	8.46	0.82	0.11	8.25	8.67	5.7	10.3	4.6
	3	24	8.23	0.75	0.15	7.92	8.55	6.6	9.6	3
	Gesamt	119	8.33	0.8	0.07	8.19	8.48	5.7	10.3	4.6
hb28	1	33	8.15	0.5	0.09	7.98	8.33	6.6	9.2	2.6
	2	59	8.08	0.63	0.08	7.92	8.24	6.4	9.6	3.2
	3	24	8.31	0.6	0.12	8.06	8.56	7.3	9.3	2
	Gesamt	116	8.15	0.59	0.05	8.04	8.26	6.4	9.6	3.2
hb42	1	33	8.73	0.51	0.09	8.55	8.91	7.5	9.6	2.1
	2	59	8.68	0.84	0.11	8.46	8.89	5.8	10.5	4.7
	3	24	8.85	0.77	0.16	8.52	9.17	6.8	10.5	3.7
	Gesamt	116	8.73	0.74	0.07	8.59	8.86	5.8	10.5	4.7
ery0	1	34	6.83	0.55	0.09	6.64	7.02	5.75	8.27	2.52
	2	59	6.93	0.58	0.08	6.77	7.08	5.28	8.36	3.08
	3	22	6.89	0.5	0.11	6.67	7.11	6.14	8.13	1.99
	Gesamt	115	6.89	0.55	0.05	6.79	6.99	5.28	8.36	3.08
ery14	1	35	7.03	0.69	0.12	6.8	7.27	5.62	8.08	2.46
	2	60	7.2	0.8	0.1	7	7.41	5.49	9.63	4.14
	3	24	7.16	0.55	0.11	6.93	7.39	6.08	8.04	1.96
	Gesamt	119	7.15	0.72	0.07	7.01	7.28	5.49	9.63	4.14
ery28	1	33	6.97	0.64	0.11	6.74	7.19	5.75	8.75	3
	2	59	6.89	0.64	0.08	6.72	7.06	5.38	8.95	3.57
	3	24	7.23	0.55	0.11	7	7.46	6.06	7.94	1.88
	Gesamt	116	6.98	0.63	0.06	6.87	7.1	5.38	8.95	3.57
ery42	1	33	7.41	0.62	0.11	7.19	7.63	6.4	9.1	2.7
	2	59	7.32	0.77	0.1	7.12	7.52	6	9.3	3.3
	3	24	7.63	0.69	0.14	7.33	7.92	6.4	9.2	2.8
	Gesamt	116	7.41	0.72	0.07	7.28	7.54	6	9.3	3.3
htk0	1	34	0.39	0.02	0	0.38	0.39	0.34	0.44	0.1
	2	59	0.39	0.03	0	0.38	0.39	0.3	0.46	0.16
	3	22	0.38	0.02	0.01	0.37	0.39	0.35	0.43	0.08
	Gesamt	115	0.39	0.03	0	0.38	0.39	0.3	0.46	0.16
htk14	1	35	0.39	0.04	0.01	0.38	0.4	0.31	0.46	0.15
	2	60	0.4	0.04	0	0.39	0.41	0.28	0.48	0.2
	3	24	0.39	0.04	0.01	0.37	0.4	0.33	0.46	0.13
	Gesamt	119	0.39	0.04	0	0.39	0.4	0.28	0.48	0.2
htk28	1	33	0.39	0.03	0	0.39	0.4	0.33	0.43	0.1
	2	59	0.39	0.03	0	0.38	0.39	0.31	0.45	0.14
	3	24	0.4	0.03	0.01	0.38	0.41	0.35	0.46	0.11
	Gesamt	116	0.39	0.03	0	0.39	0.4	0.31	0.46	0.15
htk42	1	33	0.42	0.03	0	0.41	0.43	0.36	0.48	0.12
	2	59	0.41	0.04	0.01	0.4	0.42	0.3	0.51	0.21
	3	24	0.42	0.04	0.01	0.41	0.44	0.36	0.5	0.14
	Gesamt	116	0.41	0.04	0	0.41	0.42	0.3	0.51	0.21
mchc0	1	34	20.91	0.67	0.12	20.68	21.15	19.8	23.6	3.8
	2	59	21.11	0.57	0.07	20.96	21.26	19.9	22.4	2.5
	3	22	21.17	0.52	0.11	20.94	21.4	20	22.2	2.2
	Gesamt	115	21.06	0.6	0.06	20.95	21.17	19.8	23.6	3.8
mchc14	1	35	21.29	1.64	0.28	20.72	21.85	20	30	10
	2	60	21.37	0.76	0.1	21.17	21.56	19	24	5
	3	24	21.33	0.48	0.1	21.13	21.54	21	22	1
	Gesamt	119	21.34	1.05	0.1	21.15	21.53	19	30	11
mchc28	1	33	20.92	1.46	0.25	20.41	21.44	19.6	28.6	9
	2	59	20.89	0.69	0.09	20.71	21.07	19.6	22.9	3.3
	3	24	20.95	0.59	0.12	20.7	21.21	19.7	22.2	2.5
	Gesamt	116	20.91	0.95	0.09	20.74	21.09	19.6	28.6	9
mchc42	1	33	20.98	0.71	0.12	20.73	21.23	19.4	22.1	2.7
	2	59	21.3	0.53	0.07	21.16	21.44	19.7	22.3	2.6
	3	24	21.16	0.66	0.14	20.88	21.44	19.4	22.3	2.9
	Gesamt	116	21.18	0.62	0.06	21.07	21.29	19.4	22.3	2.9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk: Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N:

Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: CC, 2: CT, 3: TT

## Assoziation von EE11\_2 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	13	8,11	0,48	0,13	7,82	8,39	7,3	8,8	1,5
	2	57	8,18	0,56	0,07	8,03	8,33	6,5	9,5	3
	3	45	8,02	0,63	0,09	7,83	8,21	6,1	10,3	4,2
	Gesamt	115	8,11	0,58	0,05	8	8,22	6,1	10,3	4,2
hb14	1	14	8,39	0,84	0,23	7,9	8,87	6,6	9,6	3
	2	59	8,53	0,82	0,11	8,32	8,75	5,7	10,3	4,6
	3	46	8,07	0,7	0,1	7,86	8,28	6,3	9,2	2,9
	Gesamt	119	8,34	0,8	0,07	8,19	8,48	5,7	10,3	4,6
hb28	1	14	8,45	0,54	0,14	8,14	8,76	7,7	9,3	1,6
	2	57	8,16	0,62	0,08	7,99	8,32	6,4	9,6	3,2
	3	45	8,08	0,63	0,09	7,89	8,27	6,6	10,3	3,7
	Gesamt	116	8,16	0,62	0,06	8,05	8,28	6,4	10,3	3,9
hb42	1	14	8,88	0,91	0,24	8,35	9,4	6,8	10,5	3,7
	2	57	8,76	0,82	0,11	8,55	8,98	5,8	10,5	4,7
	3	45	8,65	0,61	0,09	8,47	8,84	7	10,3	3,3
	Gesamt	116	8,74	0,75	0,07	8,6	8,87	5,8	10,5	4,7
ery0	1	13	6,9	0,59	0,16	6,54	7,25	6,14	8,13	1,99
	2	57	6,98	0,57	0,08	6,83	7,13	5,81	8,36	2,55
	3	45	6,78	0,52	0,08	6,62	6,93	5,28	8,28	3
	Gesamt	115	6,89	0,55	0,05	6,79	6,99	5,28	8,36	3,08
ery14	1	14	7,26	0,55	0,15	6,95	7,58	6,44	7,9	1,46
	2	59	7,28	0,77	0,1	7,08	7,49	5,49	9,63	4,14
	3	46	6,92	0,64	0,09	6,73	7,11	5,62	8,05	2,43
	Gesamt	119	7,14	0,72	0,07	7,01	7,27	5,49	9,63	4,14
ery28	1	14	7,29	0,53	0,14	6,99	7,6	6,06	7,89	1,83
	2	57	6,98	0,63	0,08	6,82	7,15	5,73	8,95	3,22
	3	45	6,89	0,66	0,1	6,69	7,09	5,38	8,75	3,37
	Gesamt	116	6,99	0,64	0,06	6,87	7,1	5,38	8,95	3,57
ery42	1	14	7,62	0,76	0,2	7,18	8,06	6,4	9,2	2,8
	2	57	7,44	0,78	0,1	7,23	7,65	6	9,3	3,3
	3	45	7,3	0,6	0,09	7,12	7,48	6,2	9,1	2,9
	Gesamt	116	7,41	0,72	0,07	7,28	7,54	6	9,3	3,3
htk0	1	13	0,38	0,02	0,01	0,37	0,4	0,35	0,43	0,08
	2	57	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,32	0,46	0,14
	3	45	0,38	0,03	0	0,37	0,39	0,3	0,48	0,18
	Gesamt	115	0,39	0,03	0	0,38	0,39	0,3	0,48	0,18
htk14	1	14	0,39	0,04	0,01	0,37	0,42	0,33	0,46	0,13
	2	59	0,4	0,04	0	0,39	0,41	0,28	0,48	0,2
	3	46	0,38	0,03	0	0,37	0,39	0,31	0,44	0,13
	Gesamt	119	0,39	0,04	0	0,39	0,4	0,28	0,48	0,2
htk28	1	14	0,41	0,02	0,01	0,39	0,42	0,37	0,46	0,09
	2	57	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,31	0,45	0,14
	3	45	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,33	0,49	0,16
	Gesamt	116	0,39	0,03	0	0,39	0,4	0,31	0,49	0,18
htk42	1	14	0,43	0,04	0,01	0,41	0,45	0,36	0,5	0,14
	2	57	0,41	0,04	0,01	0,4	0,42	0,3	0,51	0,21
	3	45	0,41	0,03	0	0,4	0,42	0,33	0,48	0,15
	Gesamt	116	0,41	0,04	0	0,41	0,42	0,3	0,51	0,21
mchc0	1	13	21,08	0,59	0,16	20,73	21,44	20	22,1	2,1
	2	57	21,1	0,57	0,08	20,95	21,25	19,9	22,4	2,5
	3	45	21,02	0,65	0,1	20,83	21,22	19,8	23,6	3,8
	Gesamt	115	21,07	0,6	0,06	20,96	21,18	19,8	23,6	3,8
mchc14	1	14	21,36	0,5	0,13	21,07	21,64	21	22	1
	2	59	21,48	1,33	0,17	21,13	21,82	19	30	11
	3	46	21,17	0,71	0,1	20,96	21,38	20	23	3
	Gesamt	119	21,35	1,05	0,1	21,15	21,54	19	30	11
mchc28	1	14	20,91	0,67	0,18	20,53	21,3	19,7	22,2	2,5
	2	57	20,97	1,17	0,16	20,66	21,28	19,6	28,6	9
	3	45	20,86	0,69	0,1	20,65	21,06	19,6	22,9	3,3
	Gesamt	116	20,92	0,95	0,09	20,74	21,09	19,6	28,6	9
mchc42	1	14	20,95	0,73	0,2	20,53	21,37	19,4	22,3	2,9
	2	57	21,31	0,52	0,07	21,18	21,45	19,7	22,3	2,6
	3	45	21,11	0,7	0,1	20,9	21,32	19,4	22,2	2,8
	Gesamt	116	21,19	0,63	0,06	21,08	21,31	19,4	22,3	2,9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk:Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N:

Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: AA, 2: AG, 3: GG

## Assoziation von EE2 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	8	7,85	0,55	0,19	7,39	8,31	6,8	8,6	1,8
	2	41	8,09	0,54	0,08	7,92	8,26	6,5	9,2	2,7
	3	66	8,13	0,56	0,07	7,99	8,27	6,1	9,5	3,4
	Gesamt	115	8,1	0,55	0,05	7,99	8,2	6,1	9,5	3,4
hb14	1	8	7,94	0,98	0,35	7,12	8,76	6,3	8,9	2,6
	2	42	8,23	0,88	0,14	7,95	8,5	5,7	10,3	4,6
	3	69	8,44	0,71	0,09	8,27	8,61	6,6	9,9	3,3
	Gesamt	119	8,33	0,8	0,07	8,19	8,48	5,7	10,3	4,6
hb28	1	7	8,11	0,77	0,29	7,4	8,83	6,6	8,6	2
	2	41	8,11	0,58	0,09	7,93	8,29	6,6	9,6	3
	3	68	8,18	0,58	0,07	8,03	8,32	6,4	9,3	2,9
	Gesamt	116	8,15	0,59	0,05	8,04	8,26	6,4	9,6	3,2
hb42	1	8	8,85	0,98	0,35	8,03	9,67	7,5	10,4	2,9
	2	41	8,72	0,82	0,13	8,46	8,98	5,8	10,5	4,7
	3	67	8,72	0,67	0,08	8,55	8,88	6,8	10,5	3,7
	Gesamt	116	8,73	0,74	0,07	8,59	8,86	5,8	10,5	4,7
ery0	1	8	6,92	0,66	0,23	6,37	7,47	5,94	7,8	1,86
	2	41	6,98	0,57	0,09	6,8	7,16	5,75	8,36	2,61
	3	66	6,83	0,53	0,07	6,7	6,96	5,28	8,16	2,88
	Gesamt	115	6,89	0,55	0,05	6,79	6,99	5,28	8,36	3,08
ery14	1	8	7,15	0,95	0,34	6,35	7,95	5,62	8,05	2,43
	2	42	7,16	0,84	0,13	6,9	7,42	5,49	9,63	4,14
	3	69	7,14	0,62	0,07	6,99	7,29	5,57	8,47	2,9
	Gesamt	119	7,15	0,72	0,07	7,01	7,28	5,49	9,63	4,14
ery28	1	7	7,32	0,93	0,35	6,45	8,18	5,75	8,75	3
	2	41	7,09	0,67	0,1	6,87	7,3	5,38	8,95	3,57
	3	68	6,89	0,56	0,07	6,75	7,02	5,73	8,41	2,68
	Gesamt	116	6,98	0,63	0,06	6,87	7,1	5,38	8,95	3,57
ery42	1	8	7,79	0,83	0,29	7,09	8,48	6,4	9,1	2,7
	2	41	7,52	0,76	0,12	7,28	7,76	6	9,3	3,3
	3	67	7,3	0,66	0,08	7,14	7,46	6,2	9,2	3
	Gesamt	116	7,41	0,72	0,07	7,28	7,54	6	9,3	3,3
htk0	1	8	0,38	0,03	0,01	0,36	0,41	0,34	0,43	0,09
	2	41	0,39	0,02	0	0,38	0,39	0,32	0,44	0,12
	3	66	0,38	0,03	0	0,38	0,39	0,3	0,46	0,16
	Gesamt	115	0,39	0,03	0	0,38	0,39	0,3	0,46	0,16
htk14	1	8	0,38	0,05	0,02	0,34	0,42	0,31	0,44	0,13
	2	42	0,39	0,04	0,01	0,38	0,4	0,28	0,48	0,2
	3	69	0,4	0,03	0	0,39	0,4	0,32	0,46	0,14
	Gesamt	119	0,39	0,04	0	0,39	0,4	0,28	0,48	0,2
htk28	1	7	0,4	0,04	0,01	0,36	0,43	0,33	0,43	0,1
	2	41	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,33	0,45	0,12
	3	68	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,31	0,46	0,15
	Gesamt	116	0,39	0,03	0	0,39	0,4	0,31	0,46	0,15
htk42	1	8	0,42	0,05	0,02	0,39	0,46	0,36	0,49	0,13
	2	41	0,41	0,04	0,01	0,4	0,43	0,3	0,51	0,21
	3	67	0,41	0,04	0	0,4	0,42	0,35	0,5	0,15
	Gesamt	116	0,41	0,04	0	0,41	0,42	0,3	0,51	0,21
mchc0	1	8	20,56	0,44	0,16	20,19	20,93	19,9	21,1	1,2
	2	41	20,91	0,4	0,06	20,78	21,03	20,1	21,9	1,8
	3	66	21,22	0,66	0,08	21,06	21,38	19,8	23,6	3,8
	Gesamt	115	21,06	0,6	0,06	20,95	21,17	19,8	23,6	3,8
mchc14	1	8	20,63	0,52	0,18	20,19	21,06	20	21	1
	2	42	21,24	0,58	0,09	21,06	21,42	20	23	3
	3	69	21,48	1,27	0,15	21,17	21,78	19	30	11
	Gesamt	119	21,34	1,05	0,1	21,15	21,53	19	30	11
mchc28	1	7	20,39	0,37	0,14	20,04	20,73	19,7	20,8	1,1
	2	41	20,78	0,47	0,07	20,63	20,92	19,8	22,1	2,3
	3	68	21,05	1,16	0,14	20,77	21,33	19,6	28,6	9
	Gesamt	116	20,91	0,95	0,09	20,74	21,09	19,6	28,6	9
mchc42	1	8	20,85	0,43	0,15	20,49	21,21	20,3	21,4	1,1
	2	41	21,15	0,62	0,1	20,95	21,34	19,5	22,2	2,7
	3	67	21,24	0,64	0,08	21,08	21,4	19,4	22,3	2,9
	Gesamt	116	21,18	0,62	0,06	21,07	21,29	19,4	22,3	2,9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk: Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N:

Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: TT, 2: TA, 3: AA

## Assoziation von ERE1 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	91	8.1	0.59	0.06	7.97	8.22	6.1	9.5	3.4
	2	5	8.06	0.33	0.15	7.65	8.47	7.7	8.6	0.9
	Gesamt	96	8.09	0.58	0.06	7.98	8.21	6.1	9.5	3.4
hb14	1	94	8.27	0.78	0.08	8.11	8.43	5.7	10.3	4.6
	2	6	8.68	0.6	0.24	8.06	9.31	8	9.7	1.7
	Gesamt	100	8.3	0.77	0.08	8.15	8.45	5.7	10.3	4.6
hb28	1	93	8.15	0.6	0.06	8.02	8.27	6.4	9.6	3.2
	2	5	8.26	0.65	0.29	7.46	9.06	7.3	9	1.7
	Gesamt	98	8.15	0.6	0.06	8.03	8.27	6.4	9.6	3.2
hb42	1	93	8.65	0.74	0.08	8.5	8.81	5.8	10.5	4.7
	2	5	9.5	0.8	0.36	8.51	10.49	8.5	10.5	2
	Gesamt	98	8.7	0.76	0.08	8.54	8.85	5.8	10.5	4.7
ery0	1	91	6.89	0.58	0.06	6.77	7.01	5.28	8.36	3.08
	2	5	6.97	0.15	0.07	6.78	7.16	6.77	7.11	0.34
	Gesamt	96	6.89	0.56	0.06	6.78	7.01	5.28	8.36	3.08
ery14	1	94	7.11	0.69	0.07	6.97	7.25	5.49	9.58	4.09
	2	6	7.43	0.52	0.21	6.89	7.97	6.71	8.08	1.37
	Gesamt	100	7.13	0.68	0.07	6.99	7.26	5.49	9.58	4.09
ery28	1	93	7	0.64	0.07	6.87	7.13	5.38	8.95	3.57
	2	5	7.05	0.71	0.32	6.17	7.93	6.2	7.98	1.78
	Gesamt	98	7	0.64	0.06	6.88	7.13	5.38	8.95	3.57
ery42	1	93	7.38	0.72	0.07	7.23	7.53	6	9.2	3.2
	2	5	8.1	0.88	0.39	7.01	9.19	7	9.3	2.3
	Gesamt	98	7.42	0.74	0.07	7.27	7.56	6	9.3	3.3
htk0	1	91	0.39	0.03	0	0.38	0.39	0.3	0.46	0.16
	2	5	0.38	0.01	0.01	0.37	0.4	0.37	0.4	0.03
	Gesamt	96	0.39	0.03	0	0.38	0.39	0.3	0.46	0.16
htk14	1	94	0.39	0.04	0	0.38	0.4	0.28	0.48	0.2
	2	6	0.41	0.03	0.01	0.38	0.44	0.38	0.46	0.08
	Gesamt	100	0.39	0.04	0	0.38	0.4	0.28	0.48	0.2
htk28	1	93	0.39	0.03	0	0.38	0.4	0.31	0.46	0.15
	2	5	0.4	0.03	0.02	0.35	0.44	0.35	0.44	0.09
	Gesamt	98	0.39	0.03	0	0.39	0.4	0.31	0.46	0.15
htk42	1	93	0.41	0.04	0	0.4	0.42	0.3	0.5	0.2
	2	5	0.46	0.05	0.02	0.4	0.52	0.4	0.51	0.11
	Gesamt	98	0.41	0.04	0	0.41	0.42	0.3	0.51	0.21
mchc0	1	91	21.06	0.61	0.06	20.93	21.19	19.9	23.6	3.7
	2	5	21.06	0.43	0.19	20.52	21.6	20.7	21.7	1
	Gesamt	96	21.06	0.6	0.06	20.94	21.18	19.9	23.6	3.7
mchc14	1	94	21.26	0.69	0.07	21.12	21.4	19	24	5
	2	6	21.17	0.41	0.17	20.74	21.6	21	22	1
	Gesamt	100	21.25	0.67	0.07	21.12	21.38	19	24	5
mchc28	1	93	20.86	0.64	0.07	20.72	20.99	19.6	22.9	3.3
	2	5	20.74	0.27	0.12	20.4	21.08	20.4	21.1	0.7
	Gesamt	98	20.85	0.63	0.06	20.72	20.98	19.6	22.9	3.3
mchc42	1	93	21.17	0.6	0.06	21.05	21.29	19.4	22.3	2.9
	2	5	20.76	0.65	0.29	19.96	21.56	19.7	21.4	1.7
	Gesamt	98	21.15	0.61	0.06	21.03	21.27	19.4	22.3	2.9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk: Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N: Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: CC, 2: CT

## Assoziation von ERE1\_2 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	87	8.08	0.56	0.06	7.96	8.2	6.1	9.5	3.4
	2	7	8.19	0.35	0.13	7.86	8.51	7.7	8.6	0.9
	Gesamt	94	8.09	0.55	0.06	7.97	8.2	6.1	9.5	3.4
hb14	1	90	8.33	0.8	0.08	8.17	8.5	5.7	10.3	4.6
	2	8	8.66	0.62	0.22	8.14	9.18	7.8	9.7	1.9
	Gesamt	98	8.36	0.79	0.08	8.2	8.52	5.7	10.3	4.6
hb28	1	89	8.2	0.57	0.06	8.08	8.32	6.6	9.6	3
	2	6	8.2	0.49	0.2	7.68	8.72	7.3	8.6	1.3
	Gesamt	95	8.2	0.56	0.06	8.08	8.31	6.6	9.6	3
hb42	1	89	8.7	0.77	0.08	8.54	8.86	5.8	10.5	4.7
	2	6	9.18	0.63	0.26	8.52	9.84	8.5	10.1	1.6
	Gesamt	95	8.73	0.77	0.08	8.57	8.89	5.8	10.5	4.7
ery0	1	87	6.84	0.55	0.06	6.73	6.96	5.28	8.36	3.08
	2	7	7.02	0.23	0.09	6.8	7.23	6.77	7.44	0.67
	Gesamt	94	6.86	0.54	0.06	6.75	6.97	5.28	8.36	3.08
ery14	1	90	7.12	0.7	0.07	6.97	7.26	5.49	9.58	4.09
	2	8	7.42	0.54	0.19	6.96	7.87	6.71	8.08	1.37
	Gesamt	98	7.14	0.69	0.07	7	7.28	5.49	9.58	4.09
ery28	1	89	6.99	0.61	0.06	6.86	7.12	5.38	8.95	3.57
	2	6	6.98	0.52	0.21	6.43	7.53	6.2	7.53	1.33
	Gesamt	95	6.99	0.6	0.06	6.86	7.11	5.38	8.95	3.57
ery42	1	89	7.37	0.73	0.08	7.21	7.52	6	9.3	3.3
	2	6	7.72	0.57	0.23	7.12	8.32	7	8.6	1.6
	Gesamt	95	7.39	0.73	0.07	7.24	7.54	6	9.3	3.3
htk0	1	87	0.38	0.03	0	0.38	0.39	0.3	0.46	0.16
	2	7	0.39	0.01	0	0.37	0.4	0.37	0.4	0.03
	Gesamt	94	0.38	0.03	0	0.38	0.39	0.3	0.46	0.16
htk14	1	90	0.39	0.04	0	0.38	0.4	0.28	0.48	0.2
	2	8	0.41	0.03	0.01	0.39	0.44	0.37	0.46	0.09
	Gesamt	98	0.39	0.04	0	0.39	0.4	0.28	0.48	0.2
htk28	1	89	0.39	0.03	0	0.39	0.4	0.33	0.46	0.13
	2	6	0.4	0.03	0.01	0.37	0.42	0.35	0.42	0.07
	Gesamt	95	0.39	0.03	0	0.39	0.4	0.33	0.46	0.13
htk42	1	89	0.41	0.04	0	0.41	0.42	0.3	0.5	0.2
	2	6	0.44	0.04	0.02	0.39	0.48	0.39	0.51	0.12
	Gesamt	95	0.41	0.04	0	0.41	0.42	0.3	0.51	0.21
mchc0	1	87	21.06	0.6	0.06	20.93	21.19	19.8	23.6	3.8
	2	7	21.21	0.34	0.13	20.9	21.53	20.7	21.7	1
	Gesamt	94	21.07	0.59	0.06	20.95	21.19	19.8	23.6	3.8
mchc14	1	90	21.41	1.12	0.12	21.18	21.65	20	30	10
	2	8	21.13	0.35	0.13	20.83	21.42	21	22	1
	Gesamt	98	21.39	1.08	0.11	21.17	21.6	20	30	10
mchc28	1	89	20.94	1.06	0.11	20.71	21.16	19.6	28.6	9
	2	6	20.75	0.24	0.1	20.5	21	20.4	21.1	0.7
	Gesamt	95	20.93	1.03	0.11	20.72	21.13	19.6	28.6	9
mchc42	1	89	21.14	0.64	0.07	21.01	21.28	19.4	22.3	2.9
	2	6	21.02	0.73	0.3	20.25	21.78	19.7	21.6	1.9
	Gesamt	95	21.13	0.64	0.07	21	21.26	19.4	22.3	2.9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk: Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N: Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: TT, 2: TG

## Assoziation von ERE5 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	34	8	0,55	0,09	7,8	8,19	6,5	9,1	2,6
	2	41	8,13	0,6	0,09	7,94	8,32	6,1	9,5	3,4
	3	18	8,26	0,5	0,12	8,01	8,5	7,5	9,2	1,7
	Gesamt	93	8,11	0,57	0,06	7,99	8,22	6,1	9,5	3,4
hb14	1	35	8,25	0,78	0,13	7,98	8,52	5,7	9,3	3,6
	2	43	8,37	0,77	0,12	8,13	8,61	6,6	9,9	3,3
	3	19	8,53	0,83	0,19	8,13	8,93	7,1	10,3	3,2
	Gesamt	97	8,36	0,78	0,08	8,2	8,52	5,7	10,3	4,6
hb28	1	35	8,1	0,61	0,1	7,89	8,31	6,4	9,1	2,7
	2	43	8,13	0,53	0,08	7,97	8,3	7	9,3	2,3
	3	18	8,44	0,67	0,16	8,11	8,78	7	9,6	2,6
	Gesamt	96	8,18	0,6	0,06	8,06	8,3	6,4	9,6	3,2
hb42	1	35	8,59	0,72	0,12	8,34	8,83	5,8	9,5	3,7
	2	42	8,72	0,8	0,12	8,47	8,97	6,8	10,5	3,7
	3	18	9,01	0,7	0,16	8,66	9,35	7,8	10,5	2,7
	Gesamt	95	8,72	0,76	0,08	8,57	8,88	5,8	10,5	4,7
ery0	1	34	6,78	0,57	0,1	6,58	6,98	5,81	8,27	2,46
	2	41	6,88	0,51	0,08	6,72	7,04	5,28	8,07	2,79
	3	18	7,13	0,59	0,14	6,83	7,42	6,41	8,36	1,95
	Gesamt	93	6,89	0,55	0,06	6,78	7,01	5,28	8,36	3,08
ery14	1	35	7,04	0,69	0,12	6,81	7,28	5,49	8,06	2,57
	2	43	7,09	0,61	0,09	6,91	7,28	5,63	8,47	2,84
	3	19	7,46	0,82	0,19	7,07	7,86	6,08	9,58	3,5
	Gesamt	97	7,15	0,69	0,07	7,01	7,29	5,49	9,58	4,09
ery28	1	35	6,9	0,58	0,1	6,7	7,1	5,89	8,34	2,45
	2	43	6,91	0,5	0,08	6,75	7,06	5,92	8,41	2,49
	3	18	7,35	0,84	0,2	6,93	7,77	5,38	8,95	3,57
	Gesamt	96	6,99	0,62	0,06	6,86	7,12	5,38	8,95	3,57
ery42	1	35	7,25	0,62	0,1	7,03	7,46	6,3	8,6	2,3
	2	42	7,39	0,74	0,11	7,16	7,62	6	9,2	3,2
	3	18	7,73	0,84	0,2	7,32	8,15	6,5	9,3	2,8
	Gesamt	95	7,4	0,73	0,07	7,25	7,55	6	9,3	3,3
htk0	1	34	0,38	0,03	0	0,37	0,39	0,32	0,44	0,12
	2	41	0,39	0,03	0	0,38	0,39	0,3	0,46	0,16
	3	18	0,39	0,03	0,01	0,38	0,41	0,35	0,46	0,11
	Gesamt	93	0,39	0,03	0	0,38	0,39	0,3	0,46	0,16
htk14	1	35	0,39	0,04	0,01	0,38	0,4	0,28	0,45	0,17
	2	43	0,39	0,03	0,01	0,38	0,4	0,32	0,46	0,14
	3	19	0,4	0,04	0,01	0,38	0,42	0,33	0,48	0,15
	Gesamt	97	0,39	0,04	0	0,39	0,4	0,28	0,48	0,2
htk28	1	35	0,39	0,03	0,01	0,38	0,4	0,31	0,43	0,12
	2	43	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,34	0,45	0,11
	3	18	0,4	0,03	0,01	0,39	0,42	0,33	0,46	0,13
	Gesamt	96	0,39	0,03	0	0,39	0,4	0,31	0,46	0,15
htk42	1	35	0,41	0,04	0,01	0,4	0,42	0,3	0,48	0,18
	2	42	0,41	0,04	0,01	0,4	0,42	0,33	0,51	0,18
	3	18	0,43	0,04	0,01	0,41	0,44	0,36	0,5	0,14
	Gesamt	95	0,41	0,04	0	0,41	0,42	0,3	0,51	0,21
mchc0	1	34	21,06	0,77	0,13	20,79	21,33	19,8	23,6	3,8
	2	41	21,11	0,45	0,07	20,97	21,25	20,3	22,3	2
	3	18	21,02	0,47	0,11	20,79	21,25	20,2	21,8	1,6
	Gesamt	93	21,08	0,59	0,06	20,96	21,2	19,8	23,6	3,8
mchc14	1	35	21,31	1,71	0,29	20,73	21,9	19	30	11
	2	43	21,51	0,63	0,1	21,32	21,71	20	23	3
	3	19	21,21	0,54	0,12	20,95	21,47	20	22	2
	Gesamt	97	21,38	1,13	0,11	21,15	21,61	19	30	11
mchc28	1	35	20,71	0,7	0,12	20,47	20,95	19,6	22,9	3,3
	2	43	21,13	1,31	0,2	20,72	21,53	19,7	28,6	8,9
	3	18	20,89	0,59	0,14	20,6	21,18	20	22,2	2,2
	Gesamt	96	20,93	1,01	0,1	20,72	21,14	19,6	28,6	9
mchc42	1	35	21,05	0,69	0,12	20,81	21,29	19,4	22,2	2,8
	2	42	21,32	0,49	0,08	21,17	21,48	19,7	22,2	2,5
	3	18	21,15	0,61	0,14	20,85	21,45	19,8	22,3	2,5
	Gesamt	95	21,19	0,6	0,06	21,07	21,31	19,4	22,3	2,9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk: Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N: Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: TT, 2: CT, 3: CC

## Assoziation von ERE7 mit HB, HKT, Erythrozytenzahl und MCHC

	Genotyp	N	M	SD	SE	CI95l	CI95u	Min.	Max.	R
hb0	1	40	8	0,52	0,08	7,83	8,16	6,5	9	2,5
	2	53	8,08	0,6	0,08	7,92	8,25	6,1	9,5	3,4
	3	22	8,32	0,45	0,1	8,12	8,52	7,7	9,2	1,5
	Gesamt	115	8,1	0,55	0,05	7,99	8,2	6,1	9,5	3,4
hb14	1	41	8,24	0,76	0,12	8	8,48	5,7	9,3	3,6
	2	55	8,25	0,81	0,11	8,04	8,47	6,3	9,9	3,6
	3	23	8,68	0,77	0,16	8,35	9,02	7,4	10,3	2,9
	Gesamt	119	8,33	0,8	0,07	8,19	8,48	5,7	10,3	4,6
hb28	1	40	8,09	0,57	0,09	7,9	8,27	6,4	9,1	2,7
	2	54	8,02	0,58	0,08	7,87	8,18	6,6	9,3	2,7
	3	22	8,57	0,49	0,1	8,35	8,78	7,3	9,6	2,3
	Gesamt	116	8,15	0,59	0,05	8,04	8,26	6,4	9,6	3,2
hb42	1	41	8,61	0,73	0,11	8,39	8,84	5,8	10,4	4,6
	2	54	8,66	0,76	0,1	8,45	8,87	6,8	10,5	3,7
	3	21	9,12	0,61	0,13	8,84	9,39	8,1	10,5	2,4
	Gesamt	116	8,73	0,74	0,07	8,59	8,86	5,8	10,5	4,7
ery0	1	40	6,77	0,52	0,08	6,6	6,93	5,81	8,27	2,46
	2	53	6,82	0,51	0,07	6,68	6,96	5,28	8,07	2,79
	3	22	7,28	0,57	0,12	7,03	7,53	6,58	8,36	1,78
	Gesamt	115	6,89	0,55	0,05	6,79	6,99	5,28	8,36	3,08
ery14	1	41	7,07	0,65	0,1	6,87	7,28	5,49	8,06	2,57
	2	55	6,99	0,65	0,09	6,81	7,16	5,62	8,47	2,85
	3	23	7,65	0,81	0,17	7,3	8	6,37	9,63	3,26
	Gesamt	119	7,15	0,72	0,07	7,01	7,28	5,49	9,63	4,14
ery28	1	40	6,94	0,57	0,09	6,75	7,12	5,89	8,34	2,45
	2	54	6,79	0,54	0,07	6,65	6,94	5,38	7,93	2,55
	3	22	7,53	0,67	0,14	7,24	7,83	6,2	8,95	2,75
	Gesamt	116	6,98	0,63	0,06	6,87	7,1	5,38	8,95	3,57
ery42	1	41	7,29	0,63	0,1	7,09	7,49	6,2	8,6	2,4
	2	54	7,3	0,72	0,1	7,1	7,49	6	9,2	3,2
	3	21	7,93	0,69	0,15	7,61	8,24	6,9	9,3	2,4
	Gesamt	116	7,41	0,72	0,07	7,28	7,54	6	9,3	3,3
htk0	1	40	0,38	0,03	0	0,37	0,39	0,32	0,44	0,12
	2	53	0,38	0,03	0	0,38	0,39	0,3	0,46	0,16
	3	22	0,4	0,02	0,01	0,39	0,41	0,36	0,46	0,1
	Gesamt	115	0,39	0,03	0	0,38	0,39	0,3	0,46	0,16
htk14	1	41	0,39	0,04	0,01	0,38	0,4	0,28	0,45	0,17
	2	55	0,39	0,04	0	0,38	0,4	0,31	0,46	0,15
	3	23	0,41	0,04	0,01	0,39	0,42	0,34	0,48	0,14
	Gesamt	119	0,39	0,04	0	0,39	0,4	0,28	0,48	0,2
htk28	1	40	0,39	0,03	0	0,38	0,4	0,31	0,43	0,12
	2	54	0,38	0,03	0	0,38	0,39	0,32	0,43	0,11
	3	22	0,41	0,03	0,01	0,4	0,42	0,35	0,46	0,11
	Gesamt	116	0,39	0,03	0	0,39	0,4	0,31	0,46	0,15
htk42	1	41	0,41	0,04	0,01	0,4	0,42	0,3	0,49	0,19
	2	54	0,41	0,04	0,01	0,4	0,42	0,33	0,51	0,18
	3	21	0,43	0,03	0,01	0,42	0,45	0,36	0,5	0,14
	Gesamt	116	0,41	0,04	0	0,41	0,42	0,3	0,51	0,21
mchc0	1	40	21,13	0,77	0,12	20,88	21,37	19,8	23,6	3,8
	2	53	21,06	0,45	0,06	20,94	21,18	20,3	22,2	1,9
	3	22	20,96	0,56	0,12	20,72	21,21	20,1	22,3	2,2
	Gesamt	115	21,06	0,6	0,06	20,95	21,17	19,8	23,6	3,8
mchc14	1	41	21,32	1,59	0,25	20,82	21,82	19	30	11
	2	55	21,4	0,6	0,08	21,24	21,56	20	23	3
	3	23	21,22	0,67	0,14	20,93	21,51	20	22	2
	Gesamt	119	21,34	1,05	0,1	21,15	21,53	19	30	11
mchc28	1	40	20,74	0,72	0,11	20,51	20,96	19,6	22,9	3,3
	2	54	21,07	1,17	0,16	20,75	21,39	19,7	28,6	8,9
	3	22	20,84	0,65	0,14	20,55	21,13	19,7	22,2	2,5
	Gesamt	116	20,91	0,95	0,09	20,74	21,09	19,6	28,6	9
mchc42	1	41	21,12	0,69	0,11	20,9	21,34	19,4	22,3	2,9
	2	54	21,27	0,53	0,07	21,13	21,42	19,5	22,2	2,7
	3	21	21,06	0,69	0,15	20,74	21,37	19,4	22,3	2,9
	Gesamt	116	21,18	0,62	0,06	21,07	21,29	19,4	22,3	2,9

hb: Hämoglobin, ery: Erythrozytenzahl, htk: Hämatokrit, mchc: mean corpuscular hemoglobin concentration, N: Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SE: Standardfehler, CI: Konfidenzintervall (oberes und unteres), Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert, R: Spannweite, 1: TT, 2: CT, 3: CC

### Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp für ERE7 in der kommerziellen Population

Merkmal	Genotyp	N	Mittelwert	SD	CI95l	CI95u	P
RBC	CC	13	7,0562	0,72184	6,6199	7,4924	0,571
	CT	42	6,8217	0,64565	6,6205	7,0229	
	TT	35	6,8523	0,76178	6,5906	7,114	
HBb	CC	13	7,384615	0,4810512	7,093919	7,675312	0,347
	CT	42	7,2	0,433927	7,064779	7,335221	
	TT	35	7,125714	0,6714089	6,895077	7,356351	
HTC	CC	13	0,4315	0,03826	0,4084	0,4547	<0,001
	CT	42	0,3902	0,03135	0,3805	0,4	
	TT	35	0,3794	0,03694	0,3667	0,3921	
RETIS	CC	13	133,230769	46,2748921	105,267132	161,194407	0,001
	CT	42	71,121429	55,3912802	53,860291	88,382567	
	TT	35	78,428571	51,7817454	60,64092	96,216223	
CHR	CC	13	1,187692	0,0831819	1,137426	1,237959	0,338
	CT	42	1,190714	0,086006	1,163913	1,217516	
	TT	35	1,164	0,0746443	1,138359	1,189641	
MCV	CC	13	61,407692	3,9808838	59,002068	63,813316	0,001
	CT	42	57,561905	5,3278354	55,901634	59,222175	
	TT	35	55,542857	3,804122	54,236095	56,849619	
RDW	CC	13	16,961538	1,012866	16,34947	17,573607	0,407
	CT	42	16,711905	0,9867914	16,404399	17,019411	
	TT	35	17,1	1,6100786	16,546919	17,653081	
MCHb	CC	13	1,067692	0,086135	1,015641	1,119743	0,644
	CT	42	1,078095	0,0994188	1,047114	1,109076	
	TT	35	1,058857	0,0776027	1,0322	1,085515	
MCHCb	CC	13	17,387692	0,7360724	16,942888	17,832496	<0,001
	CT	42	18,756905	1,021645	18,438538	19,075272	
	TT	35	19,088571	1,0182688	18,738784	19,438359	
CHCM	CC	13	17,128462	0,8793923	16,59705	17,659873	<0,001
	CT	42	18,832857	1,0481116	18,506243	19,159472	
	TT	35	18,964	1,0567714	18,600986	19,327014	

RBC: red blood cells; HBb: Hämoglobin; HTC: Hämatokrit;

RETIS: Retikulozyten; CHR: Hämoglobingehalt von Retikulozyten ; MCV: mittleres korpuskuläres Volumen;

RDW: RedCell Distribution With / Erythrozytenverteilungsbreite; MCHb: mittleres korpuskuläres Hämoglobin;

MCHCb: mean cell hemoglobin concentration; CHCM: cellular hemoglobin concentraion mean

N: Anzahl, SD: Standardabweichung, CI95l: unteres 95%-Konfidenzintervall, CL95u: oberes 95%-

Konfidenzintervall, P: Signifikanz

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner danke ich für die Möglichkeit an der Klinik für Schweine dieses Projekt in die Tat umsetzen zu können. Er ermöglichte mir nicht nur die Anfertigung dieser Dissertation sondern unterstützte mich ebenso in allen Fragestellungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der im Labor erhobenen Daten bedanken.

Herrn PD Dr. H. Willems danke ich für die geduldige Unterstützung, während der praktischen Phase im Labor. Er stand mir in allen Fragen bezüglich der Labormethoden in Rat und Tat zur Seite. Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern des Labors der Klinik für Schweine, Bettina Hopf und Ute Stoll, für ihre Unterstützung während des Dissertationsvorhabens.

Meinen Eltern Helmut und Inge und meinem Lebensgefährten Benjamin danke ich für deren Beitrag zur Verwirklichung meiner Ziele. Ich bedanke mich bei Ihnen dafür, dass sie mich durch alle Höhen und Tiefen in der Anfertigung der Dissertation begleitet haben und mich fortwährend unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei allen Doktoranden der Klinik für Schweine für die gute Zusammenarbeit im Labor und wünsche ihnen alles Gute für ihr eigenes Dissertationsvorhaben.

Mein Dank gilt ebenso allen meinen Freunden Lena, Karin, Helene, Nicole und Julia für die fröhliche Zeit abseits der Doktorarbeit. Insbesondere danke ich Julia Oetken, die geduldig meine Arbeit auf Rechtschreibfehler und Satzbau überprüft hat.

Vielen Dank auch an den Schweinegesundheitsdienst Baden-Württemberg, insb. Herrn Dr. Lohner und Frau Dr. Müller, die mir die Blutproben der Schweine aus der kommerziellen Population zur Bearbeitung zur Verfügung gestellt haben.

Ebenfalls gilt mein Dank den Mitarbeitern des Labors der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, Gießen, insb. Herrn Prof. Dr. Moritz, für die Untersuchung der Blutproben aus der kommerziellen Population in deren Labor.

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



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

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

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

ISBN: 978-3-8359-6532-4



9 783835 196532 4