

**FLORIAN GEORG NIETFELD**

---

Etablierung von Genmarkern zur Resistenzzüchtung  
gegen die Pleuropneumonie 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 Autoren dieses Werkes.**

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

1. Auflage 2020

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

1<sup>st</sup> Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

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

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

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

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

# **Etablierung von Genmarkern zur Resistenzzüchtung gegen die Pleuropneumonie beim Schwein**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Florian Georg Nietfeld**

Tierarzt aus Bremen

Gießen, 2020

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

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

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Prof. Dr. Gesine Lühken

Tag der Disputation:

05.11.2020

„In nature’s infinite book of secrecy a little I can read.“

(William Shakespeare, 1606 Soothsayer. Antony and Cleopatra, Act1, Sc.2, l.9-10)

Für meine Familie

Teile der Dissertation wurden veröffentlicht:

Nietfeld F., Hötig D., Willems H., Valentin-Weigand P., Wurmser C., Waldmann K.H., Fries R., Reiner G. (2020) Candidate genes and gene markers for the resistance to porcine pleuropneumonia. *Mamm. Genome*. 2020 Feb;31(1-2):54-67. doi: 10.1007/s00335-019-09825-0

## Inhalt

Tabellenverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis .....	2
Abkürzungsverzeichnis .....	4
1 Einleitung .....	6
2 Literaturübersicht .....	7
2.1 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	7
2.1.1 Allgemein .....	7
2.1.2 Erreger .....	7
2.1.3 Infektion .....	8
2.1.4 Epidemiologie .....	10
2.2 Pathogenese und Virulenzfaktoren .....	11
2.2.1 Adhäsionsfaktoren im unteren Respirationstrakt .....	13
2.2.2 Beschaffung von Nährstoffen .....	14
2.2.3 Schädigung des Gewebes .....	15
2.2.4 Vermeidung des Immunsystems .....	17
2.2.5 Persistenz .....	18
2.3 Immunreaktion auf die Infektion mit <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	18
2.3.1 Angeborene Immunabwehr .....	19
2.3.2 Humorale Immunabwehr .....	19
2.3.3 Zell-assoziierte Immunantwort .....	20
2.4 Bekämpfung .....	21
2.5 Natürliche Krankheitsresistenz .....	24
2.6 Krankheitsresistenz beim Schwein .....	25
2.6.1 Krankheitsresistenz gegenüber Parasiten .....	27
2.6.2 Krankheitsresistenz gegenüber Viren .....	27
2.6.3 Krankheitsresistenz gegenüber Bakterien .....	30
2.7 Genomweite Assoziationsstudie .....	33
2.7.1 Quantitative-Trait-Locus .....	33
2.7.2 Referenzsequenzen und GWAS .....	34
3 Material und Methoden .....	37
3.1 Material .....	38
3.1.1 Versuchstiere .....	38
3.1.2 Laborgeräte .....	38
3.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	39
3.1.4 Chemikalien .....	40

3.1.5	Lösungen, Puffer und Medien .....	41
3.1.6	Kommerzielle Reagenziensysteme .....	41
3.1.7	Computer, EDV-Programme und Datenbanken .....	42
3.2	Methoden .....	45
3.2.1	Eingangsuntersuchung und experimentelle Infektion .....	45
3.2.2	Pathologische Untersuchung .....	46
3.2.3	Bakteriologische Untersuchung .....	46
3.2.4	DNA-Extraktion aus EDTA-gerinnungsgehemmtem Blut .....	46
3.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	47
3.2.6	Next-Generation-Sequencing (Second-Generation-Sequencing) .....	47
3.2.7	Bioinformatik .....	53
3.2.8	Bioinformatik - Variant-Calling .....	53
3.2.9	Qualitätskontrolle der Varianten .....	54
3.2.10	Effekte der Varianten .....	57
3.2.11	Imputation .....	58
3.2.12	Genomweite Assoziationsstudie (GWAS) .....	58
3.2.13	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) .....	59
3.2.14	Agarose-Gelelektrophorese .....	61
3.2.15	Sanger-Sequenzierung .....	61
3.2.16	Kompetitive allelspezifische PCR .....	62
4	Ergebnisse .....	64
4.1	Phänotypen der Versuchstiere .....	64
4.2	Genomweite Sequenzierung .....	68
4.3	Genomweite Assoziationsstudie .....	70
4.4	Annotation und kodierende Varianten .....	75
4.5	Kopplungsungleichgewicht .....	89
4.6	Überprüfung der Marker innerhalb einer kommerziellen Population .....	93
5	Diskussion .....	94
5.1	Phänotyp .....	94
5.2	Genetische Resistenz .....	94
5.3	Next-Generation-Sequencing .....	95
5.4	SNPs auf SSC 2 .....	97
5.5	SNPs auf SSC 12 .....	98
5.6	SNPs auf SSC 15 .....	99
5.7	Nutzung der SNPs als Marker .....	100
5.8	Fazit .....	102

6	Zusammenfassung.....	104
7	Summary.....	106
8	Literaturverzeichnis.....	107
9	Anhang.....	131
9.1	Phänotypen.....	131
9.1.1	Klinik.....	132
9.1.2	Sektion - Pathologiescore.....	133
9.1.3	RoeS - Röntgenscore.....	134
9.1.4	SoS - Sonografiescore.....	135
9.1.5	RelsoL - Reisolationscore.....	136
9.2	Abdeckung der einzelnen sequenzierten Tiere.....	137
9.3	Manhattan-Plots.....	140
9.3.1	Klinik - Kliniksscore.....	140
9.3.2	Sektion - Sektionsscore.....	142
9.3.3	RoeS - Röntgenscore.....	143
9.3.4	SoS - Sonographiescore.....	144
9.3.5	RelsoL - Reisolationscore.....	145
9.4	Verwendete Primer.....	146
9.4.1	Sanger-Sequenzierung.....	146
9.4.2	KASP-Genotypisierung.....	147
9.5	Prinzipalkomponentenanalyse der eingesetzten Tiere.....	148
9.6	Python-Skripte.....	149
9.6.1	Skript, um aus Dateien im Variant-Call-Format (.vcf) in das Programm Plink einzulesen.....	149
9.6.2	Skript, um aus Assoziationsdateien (.assoc) - erstellt durch das Programm Plink - Manhattanplots zu erstellen.....	150
9.6.3	Skript, um aus Assoziationsdateien (.assoc) - erstellt durch das Programm Plink - Q-Q-Plots zu erstellen.....	152

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Virulenzfaktoren .....	12
Tabelle 2 - Apx-Toxine von <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (Bossé et al. 2002b; Frey 1995; Sassu et al. 2017a) .....	16
Tabelle 3 - In Deutschland zugelassene Impfstoffe für <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	23
Tabelle 4 - Parameter der GATK-Filter zur Überprüfung der Richtigkeit und Qualität der Varianten ..	56
Tabelle 5 - Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion .....	60
Tabelle 6 - Reaktionsbedingungen für die Polymerase-Kettenreaktion .....	61
Tabelle 7 - Reaktionsbedingungen für die KASP-Genotypisierung .....	63
Tabelle 8 - Klinische, pathologische und mikrobielle Parameter der 163 infizierten Tiere .....	65
Tabelle 9 - Pearson-Korrelationen zwischen klinischen, pathologischen und mikrobiologischen Werten der 163 infizierten Schweine.....	66
Tabelle 10 - Einteilung der Tiere in resistent, intermediär und empfindlich sowie die dazu korrespondierenden Werte.....	67
Tabelle 11 - Einteilung der Tiere in resistent, intermediär und empfindlich sowie die dazu korrespondierenden Werte (58 Tiere) .....	73
Tabelle 12 - Signifikant mit dem Phänotyp „resistent“ oder „empfindlich“ assoziierte Varianten nach exaktem Fisher-Test .....	78
Tabelle 13 - Signifikante Varianten; mit dem „Variant Effect Predictor“ annotiert.....	81
Tabelle 14 - Sanger- und KASP-validierte Varianten mit den Genotypen und den korrespondierenden gemessenen Parametern .....	83
Tabelle 15 - Assoziation der verschiedenen Marker mit dem RHS-Wert.....	85
Tabelle 16 – Auswirkung der Anzahl positiver Allele auf die verschiedenen bestimmten Merkmale..	86
Tabelle 17 - Modelleffekte der 3 verschiedenen Varianten auf die Resistenz der infizierten Tiere.....	93
Tabelle 18 - Abdeckung der 74 sequenzierten Tiere.....	137
Tabelle 19 - Primer, die für die Varianten verwendet wurden, die mittels Sanger-Genotypisierung überprüft wurden.....	146
Tabelle 20 - Sequenzen und markierte Allele der Varianten, die mittels KASP-Genotypisierung überprüft wurden.....	147

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Schematische Darstellung des theoretischen Ablaufs einer genomweiten Assoziationsstudie (Quelle: (Ikegawa 2012)) .....	35
Abbildung 2 - Flussdiagramm zum Ablauf des Versuchs.....	37
Abbildung 3 - Schematische Darstellung des Next-Generation-Sequencing (Courtesy of Illumina, Inc.) .....	49
Abbildung 4 - Schematischer Ablauf der Probenvor- und –nachbereitung für das NGS .....	50
Abbildung 5 - Bioinformatische Aufarbeitung der Rohdaten.....	57
Abbildung 6 - Die RHS-Werte - auf der y-Achse aufgetragen gegen die 163 infizierten phänotypisierten Tiere auf der x-Achse.....	67
Abbildung 7 - Die RHS-Werte - auf der y-Achse aufgetragen gegen die 74 zur Sequenzierung ausgewählten Tiere auf der x-Achse .....	68
Abbildung 8 - Abdeckung der Sequenzen der 74 sequenzierten Tiere .....	69
Abbildung 9 - Manhattan-Plot des qualitativen Phänotyps und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere .....	71
Abbildung 10 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des qualitativen Phänotyps und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere.....	72
Abbildung 11 - Vergleich des RHS-Wertes der 37 als resistent angenommenen Tiere (y-Achse, rechts – blaue Säulen) mit der jeweiligen Steigung zwischen den einzelnen Tieren (y-Achse, rechts – orange Säulen).....	73
Abbildung 12 - RHS-Werte der 58 ausgewählten Tiere (21 resistent, 37 empfindlich) .....	74
Abbildung 13 - Manhattan-Plot mit dem qualitativen Phänotyp und 21 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren .....	74
Abbildung 14 - Q-Q-Plot zu Abbildung 13 .....	75
Abbildung 15 - Manhattan-Plot mit dem qualitativen Phänotyp und 21 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren .....	76
Abbildung 16 - Q-Q-Plot zu Abbildung 15 .....	77
Abbildung 17 - Mittelwerte und Standardabweichung des RHS-Wertes bezogen auf die gefundenen Varianten auf SSC2, SSC 12 und SSC 15 mit den einzelnen Genotypen .....	87
Abbildung 18 - Mittelwerte und Standardabweichung des RHS-Wertes bezogen auf den kombinierten Effekt der positiven Varianten auf SSC 2 (2_45022788), SSC 12 (14641621) und SSC 15 (15_128476618) .....	88
Abbildung 19 - Kopplungsungleichgewicht (LD-Plot) für das SPON1(f-Spondin)-Gen .....	90
Abbildung 20 - Kopplungsungleichgewicht (LD-Plot) für das PECAM1(CD31)-Gen .....	91

Abbildung 21 - Kopplungsungleichgewicht (LD-Plot) für das COL4A4-Gen .....	92
Abbildung 22 - Klink-Werte graphisch dargestellt .....	132
Abbildung 23 - Sektion-Werte graphisch dargestellt .....	133
Abbildung 24 - RoeS-Werte graphisch dargestellt .....	134
Abbildung 25 - SoS-Werte graphisch dargestellt .....	135
Abbildung 26 - RelsoL-Werte graphisch dargestellt.....	136
Abbildung 27 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp Klinik und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren .....	140
Abbildung 28 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des quantitativen Phänotyps Klinik und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere.....	141
Abbildung 29 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp Sektion und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren .....	142
Abbildung 30 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des quantitativen Phänotyps Sektion und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere.....	142
Abbildung 31 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp RoeS(Röntgenscore) und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren.....	143
Abbildung 32 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des quantitativen Phänotyps RoeS und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere.....	143
Abbildung 33 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp SoS (Sonographiescore) und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren.....	144
Abbildung 34 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des quantitativen Phänotyps SoS und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere.....	144
Abbildung 35 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp RelsoL (Reisolationsscore) und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren.....	145
Abbildung 36 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des quantitativen Phänotyps RelsoL und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere.....	145
Abbildung 37 - Principalkomponentenanalyse der eingesetzten Tiere .....	148

## Abkürzungsverzeichnis

Anova	Analysis-of-Variance
BALF	Bronchoalveolarflüssigkeit
BHZP	Bundeshybridzuchtprogramm
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
LD	Kopplungungleichgewicht
LOD	Logarithm-of-Odds
LPS	Lipopolysaccharid
Mb	Megabasenpaare
min	Minute
Mio.	Millionen
µl	Mikroliter
mM	millimolar
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-Generation-Sequencing
OMP	Outer-Membrane-Proteins
PCR	Polymerase-Chain-Reaction

## Abkürzungsverzeichnis

---

p.i.	post infectionem
PRDC	Porcine Respiratory Disease Complex
QTL	Quantitative Trait Locus
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RHS	Respiratory Health Score
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
SSC	Sus scrofa-Chromosome
Taq	Thermus aquaticus
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
www	World-wide-Web
>	größer als
<	kleiner als
%	Prozent

# 1 Einleitung

Infektionskrankheiten begleiten die Tierhaltung von Anfang an. Sie lassen sich nur schwer kontrollieren und führen auch heute zu massiven Leistungseinbußen, Tierverlusten, Schmerzen, Leiden und Schäden. Der Einsatz antibiotisch wirksamer Substanzen und der Vakzination als immunstimulierende Therapie stellen zwar grundsätzlich Möglichkeiten zur Überwindung von Infektionserregern und den gekoppelten Krankheiten dar, scheitern aber oft an Resistenzen und der Verfügbarkeit wirksamer Impfstoffe, besonders bei Erregern mit geringer Kreuzimmunität. Außerdem werden beide in ihrer Anwendung gesellschaftlich hinterfragt, insbesondere vor dem Hintergrund der verbesserungswürdigen Haltungsbedingungen der Tiere.

In der Praxis sind gerade Atemwegserreger für einen Großteil der wirtschaftlichen Verluste in der Schweineproduktion in Deutschland und der Welt verantwortlich. *Actinobacillus Pleuropneumoniae* (*A. Pleuropneumoniae*) spielt dabei eine herausragende Rolle. Der Erreger ist mehr oder weniger ubiquitär verbreitet, kommt jedoch in Stämmen mit stark unterschiedlicher Virulenz vor, die zu perakuten, akuten, chronischen oder subklinischen Verläufen führen können. So entstehen erheblich verminderte Tageszunahmen, vermehrte Todesfälle und hohe Kosten für die tierärztliche Behandlung der erkrankten Tiere. Die jährlichen Gesamteinbußen summieren sich auf mehrere Millionen Euro allein in Deutschland.

Der Einsatz von Antibiotika zur Behandlung bakterieller Infektionen wird mehr und mehr zum Problem, zum Politikum, zur Messlatte der Verbraucherakzeptanz. Die Vakzination stößt durch fehlende Kreuzimmunität regelmäßig an ihre Grenzen.

Daher könnte die natürliche genetische Resistenz gegen Infektionskrankheiten eine alternative Prophylaxemöglichkeit der Zukunft darstellen. Sie könnte die dringend notwendigen Bemühungen um die Senkung des Infektionsdrucks und Steigerung der Resistenzlage der Tiere durch verbesserte Haltung maßgeblich unterstützen. Doch obwohl genetische Resistenzen für praktisch jede Erreger-Wirts-Interaktion bekannt sind, konnten bislang nur die seltenen monogenen Resistenzen gegen die Ödemkrankheit und die *E.coli*-Diarrhoe effizient genutzt werden. Andere Resistenzen lassen den direkten Zugang zu geeigneten Markern weitgehend vermissen. Das gilt auch für die Resistenz gegen *A. pleuropneumoniae*. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im genomweiten Screening von Schweinen unterschiedlicher Resistenz gegen die von *A. pleuropneumoniae* ausgelöste Pleuropneumonie Genmarker für diese Resistenz zu etablieren, die diagnostisch und züchterisch genutzt werden könnten, um die Empfindlichkeit gegenüber *A. Pleuropneumoniae* zu reduzieren.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

#### 2.1.1 Allgemein

Das Bakterium *A. pleuropneumoniae* gehört zur Familie der *Pasteurellaceae* und ist ein kleines gramnegatives Stäbchenbakterium mit einer typischen kokkoiden Form. *Actinobacillus spp.* kommen in verschiedenen Tierarten und beim Menschen vor und verursachen klinische Erkrankungen unterschiedlicher Schwere. Die Erreger sind vornehmlich im oberen Respirationstrakt, speziell im Nasen- und Rachenraum, und in den Krypten der Tonsillen zu finden (Rycroft et al. 2000). Im Tierreich ist speziell *Actinobacillus lignieresii* als wichtiger Vertreter der Aktinobazillen und Verursacher der Aktinobazillose von Rind und Schaf zu erwähnen. Durch eine Infektion über die Kopfschleimhäute kommt es zu einer granulomatösen Weichteilschwellung, häufig im Bereich des Zungengrundes; daher auch der umgangssprachliche Name „Holzzunge“ (Lignières, J., G. Spitz. 1902). Beim Fohlen verursacht *Actinobacillus equuli*, ein weiterer wichtiger Vertreter dieser Spezies, einen akuten Krankheitsverlauf mit schwerwiegenden, oft tödlichen Septikämien. Beim Menschen sind Infektionen mit *Actinobacillus actinomycetemcomitans* im Mundraum in Verbindung mit periodontalen Erkrankungen beschrieben (Rycroft et al. 2000).

#### 2.1.2 Erreger

Die porcine Pleuropneumonie, ausgelöst durch das Bakterium *Actinobacillus pleuropneumoniae*, führt als hochgradig kontagiöse Lungenerkrankung weltweit zu hohen ökonomischen Verlusten (Gottschalk 2012). Ursprünglich im Jahre 1957 in Großbritannien von Pattison, Howell und Elliot isoliert, wurde der Erreger unter dem Namen *Haemophilus pleuropneumoniae* bekannt (SHOPE 1964). Spätere DNA-Homologiestudien zeigten jedoch Übereinstimmungen mit *Actinobacillus lignieresii* auf, welche die Zuordnung zur Gattung *Actinobacillus* nahelegten (Pohl et al. 1983). Ein weiterer Erreger, der ebenfalls aus Schweinen mit Pleuropneumonie isoliert werden konnte, wurde anfangs aufgrund seiner fehlenden Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid Abhängigkeit als „*Pasteurella haemolytica-like*“ bezeichnet (Pohl et al. 1983), stellte sich jedoch als atypisches Biovar (II) von *A. pleuropneumoniae* heraus.

Die Infektion kann in schweren Fällen zu fibronekrotisierender Pleuropneumonie, aber auch zum plötzlichen perakuten Versterben der Tiere in allen Altersklassen führen. Überlebende Tiere haben häufig nekrotische Sequester in der Lunge, aus denen die Keime über längere Zeit immer wieder ausgeschieden werden können. Hier können effektive Wirkspiegel von Antibiotika nicht aufgebaut und der Keim daher auch nicht erreicht werden (Fittipaldi et al. 2005; Gottschalk 2012). Die enorme wirtschaftliche Bedeutung der Erkrankung setzt sich aus den Faktoren Mortalität, Produktionseinbußen und hoher Medikamenten- und Impfaufwand zusammen. Zahlreiche Quellen beschreiben außerdem erhebliche wirtschaftliche Verluste durch verringerte Tageszunahmen in chronisch infizierten Herden (Holtkamp et al. 2013; Losinger 2005).

*A. pleuropneumoniae* kann im Zusammenhang mit Viren und anderen Bakterien auch als Sekundärerreger eine Rolle spielen. So kann *A. pleuropneumoniae* eine Rolle im „Porcine Respiratory Disease Complex“ (PRDC) spielen (Thacker 2001).

Die Virulenz von *A. pleuropneumoniae* variiert sowohl zwischen als auch innerhalb der verschiedenen Serotypen (Jacobsen et al. 1996).

### 2.1.3 Infektion

Bedingt durch spezifische Faktoren wie Oberflächenrezeptoren oder eine geeignete Eisenquelle können lediglich Tiere der Spezies *Sus scrofa* von *A. pleuropneumoniae* infiziert werden (Hamer-Barrera et al. 2004; Jacques et al. 1998; Schryvers et al. 1990). Als möglicher Infektionsherd bzw. Infektionsreservoir für die kommerzielle Schweineproduktion kommen neben kolonisierten und infizierten Schweinen auch Wildschweine in Frage. Nach einer Studie von Reiner et al. sind 35,8 % der durch Jäger erlegten Wildschweine über eine PCR positiv auf *A. pleuropneumoniae* getestet worden; die Wildschweinpopulation in Slowenien besitzt sogar 50 % seropositive Tiere (Reiner et al. 2010; Vengust et al. 2006).

Mathematische Modelle zeigen, dass sich klinische Infektionen mit *A. pleuropneumoniae* besonders über bereits kolonisierte Tiere verbreiten (Klinkenberg et al. 2014). Somit ist die Transmission des Erregers zwischen kolonisierten Tieren und naiven Tieren besonders wichtig. Die Verbreitung erfolgt primär über oro-nasalen Kontakt zwischen den Tieren. Auch eine Tröpfcheninfektion durch Husten, Niesen und andere Flüssigkeiten des oberen Respirationstraktes ist über eine Entfernung von 1-2 Meter möglich (Kristensen et al. 2004; Lechtenberg et al. 1994; Nicolet et al. 1969; Velthuis et al. 2003). Tropfen mit einem Durchmesser von 0,5-3 µm, die tief in die Lungenalveolen vordringen können, sind für eine Infektion am effektivsten (Nicolet et al. 1969), wenngleich *A.*

*pleuropneumoniae* auch mehrere Kilometer über die Luft überwinden kann (Desrosiers R 1998). Die Übertragung von infizierten Sauen an ihre Ferkel wurde ab dem 10. Lebenstag nachgewiesen (Vigre et al. 2002), wobei verlängerte Säugeperioden einen negativen Einfluss auf den Infektionsverlauf der Ferkel haben können (Tobias et al. 2014). In der Zeit ab der zweiten Woche post partum bis zur zwölften Woche sind die Ferkel besonders anfällig für eine Infektion, da in dieser Zeit die maternalen Antikörper kritisch niedrige Spiegel erreichen (Chiers et al. 2002; Crujnsen et al. 1995; Gardner et al. 1991; Vigre et al. 2003).

Die porcine Pleuropneumonie kann, abhängig von Serotyp, Immunstatus und Erregeranzahl, in vier verschiedenen klinischen Formen vorkommen (Dubreuil et al. 2000; Hoeltig et al. 2009). Der typische perakute Verlauf der Erkrankung zeigt sich mit einer hohen Mortalität und plötzlichem Versterben der Tiere. Klinische Symptome hierbei sind hohes Fieber (41°C), eine erhöhte Atemfrequenz mit hochgradiger Dyspnoe, eine im Endstadium stark abfallenden Rektaltemperatur, Apathie und ein fulminantes Versagen des Herzkreislaufsystems. Verstorbene Tiere zeigen typischerweise nasalen, blutig-schaumigen Auswurf. In akuten Fällen der Erkrankung wird eine Morbidität von 10-100 % und eine Mortalität von 1-10 % erreicht (Fenwick et al. 1994; Klinkenberg et al. 2014). Die Krankheits Symptome können einander ähneln. Für die spätere Entwicklung der Erkrankung spielen die akuten Lungenschädigungen in den ersten Tagen der Infektion eine besonders wichtige Rolle (Hoeltig et al. 2009). Schweine mit subakutem Krankheitsverlauf zeigen mildere klinische Auswirkungen und weniger Verluste. Nach überstandener akuter Infektion kommt es häufig zu einer Chronifizierung der Erkrankung, wobei kaum noch klinische Anzeichen zu erkennen sind.

In der pathologischen Untersuchung finden sich hauptsächlich Läsionen in den kaudalen Lungenlappen, sowohl makroskopisch wie mikroskopisch. Im frühen Stadium sind besonders eigenwanderte neutrophile Granulozyten im Lungengewebe zu beobachten, wobei es zu Ödemen und fibrinösen Exsudationen kommt (Dubreuil et al. 2000; Ramjeet et al. 2005). Auffällig sind auch blutig-seröse Exsudationen im Thorakalraum sowie eine Pleuritis und Perikarditis. Die Blut-Luft-Schranke wird durch eine nekrotisierende Vaskulitis geschädigt, wodurch es zu Hämorrhagien kommt. Im späteren Verlauf der Erkrankung bzw. innerhalb der chronisch infizierten Tiere überwiegen die Makrophagen, und es entstehen die fibroplastische Pleuritis und nekrotisierende Sequester im Lungengewebe, umgeben von fibrotischem Gewebe (Bossé et al. 2002b; Hennig-Pauka et al. 2012; Liggett et al. 1987; Merialdi et al. 2012). Charakteristisch ist insbesondere die hämorrhagisch nekrotisierende Pleuropneumonie mit fibrinöser Pleuritis (Haesebrouck et al. 1997).

## 2.1.4 Epidemiologie

Die systematische Einteilung des Erregers erfolgt anhand der vorliegenden Kapsel-Antigene (capsular polysaccharides - CPS) in 18 verschiedene Serotypen (Bossé et al. 2017b; Sarkozi et al. 2015). Zudem bestehen Unterschiede in Bezug auf die Anforderungen bestimmter *A. pleuropneumoniae*-Stämme an Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) für das Wachstum, die zur Einteilung verwendet werden können. NAD-abhängige Stämme werden in *A. pleuropneumoniae*-Biovar-I-Stämme und Stämme, die von NAD unabhängig sind, in Biovar-II-Stämme eingeteilt. Zu den Biovar-I-Stämmen gehören typischerweise die Serotypen 1-12 sowie 15 und 16. Die Serotypen 13 und 14 sind Biovar-II-Stämme; allerdings sind Ausnahmen beschrieben (Beck et al. 1994; Dom et al. 1992a; Maldonado et al. 2009; Perry et al. 2012). Bei einigen Isolaten ist zudem keine Typisierung möglich (Ito et al. 2016), was auf die Ähnlichkeiten der Lipopolysaccharid-Strukturen zurückzuführen ist, die in den verbreiteten ELISA-Tests verwendet werden. Aufgrund eines hohen Ausmaßes an Kreuzreaktivität zwischen den Serotypen 1/9/11, 3/6/8 und 4/7 können mit den rein serologischen Verfahren bislang nur Serotyp-Gruppen identifiziert werden (Dubreuil et al. 2000; Haesebrouck et al. 1997). Neuerdings erlaubt die Serotypisierung auf molekularer Ebene eine verbesserte Einteilung der Serotypen, indem die verfügbaren Enzyme der Kapselpolysaccharid-Synthese mit Multiplex-PCR untersucht werden (Bossé et al. 2018). In verschiedenen Regionen kommen oft auch verschiedene Serotypen vor. Während in Europa der Serotyp 2 vorherrschend ist, spielt dieser in den USA eine untergeordnete Rolle. Dort sind die Serotypen 1, 5 und 6 diejenigen mit der höchsten Prävalenz. In Deutschland erreichen neben Serotyp 2 auch die Serotypen 7 und 9 die höchste Prävalenz (Dubreuil et al. 2000). Ein großes diagnostisches Problem ergibt sich aus dem geringen Zusammenhang zwischen Serotyp und Virulenz sowie aus dem Vorkommen verschiedener Serotypen auf einzelnen Betrieben und in einzelnen Proben (Broes A, Martineau GP, Gottschalk M 2007). Die Serotypen 1, 5, 9 und 11 wurden aus Tiergruppen mit schweren Lungenläsionen und hohen Verlusten isoliert. Das gilt auch für europäische Stämme vom Serotyp 2, während die amerikanischen Stämme desselben Serotyps als schwach virulent eingestuft werden (Gottschalk 2015). Ursache dafür scheint das in amerikanischen Isolaten nicht exprimierte ApxIII-Toxin zu sein, das in den europäischen Isolaten exprimiert wurde (Sassu et al. 2017a). Dem gegenüber stehen die Serotypen 2-4, 6-8, 12 und 15, die oft nur an moderaten Krankheitsverläufen mit geringen Mortalitätsraten beteiligt sind. Die Serotypen 3, 10, 13, 14 und 16 besitzen epidemiologisch eine geringe Bedeutung und werden selten in Verbindung mit einer klinischen Erkrankung isoliert (Frey 2003), aber auch schwach virulente Erreger können den Verlauf einer Infektion maßgeblich beeinflussen. Studien am Mausmodell zur Interaktion zwischen verschiedenen Serotypen zeigen eine erhöhte Anfälligkeit von Tieren gegenüber virulenten Erregern

bei vorausgegangener Infektion mit einem oder mehreren schwach virulenten Stämmen (Komal et al. 1990).

## 2.2 Pathogenese und Virulenzfaktoren

Die komplexe Pathogenese von *A. pleuropneumoniae* war bereits Subjekt ausführlicher Forschung. Schon 12 Stunden nach dem ersten Erregerkontakt können sich erste klinische Anzeichen der Infektion zeigen. Diese können bereits nach 24 Stunden zum Tod der Schweine führen (Gottschalk 2012). Die Inkubationszeit ist allerdings sehr variabel.

In der Literatur sind bereits eine Vielzahl von Virulenzfaktoren beschrieben, die bei der Adhäsion im Respirationstrakt, der Beschaffung essentieller Nährstoffe, beim Setzen von Läsionen, bei der Umgehung des Immunsystems und der Persistenz des Erregers eine Rolle spielen (Bossé et al. 2002b; Chiers et al. 2002; Chiers et al. 2010). Dabei kann *A. pleuropneumoniae* sowohl mit dem unteren als auch mit dem oberen Respirationstrakt interagieren, durch seine Virulenzfaktoren den Wirt schädigen und gleichzeitig den körpereigenen Abwehrmechanismen ausweichen und trotzen. Eine Zusammenfassung der Virulenzfaktoren ist in Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1 - Virulenzfaktoren

Virulenzfaktoren	Wirkungsweise
<u>Adhäsion</u>	
F4-Fimbrien	Adhäsion an Lungenepithelialzellen in vivo
LPS	Adhäsion an porzine Trachealringe und Mukus
OMP	Adhäsion an Kollagen
YadA-Adhäsion	Adhäsion an Kollagen, Laminin, Fibronectin, Mukus
Kapsel	Maskierung anderer Adhäsionsfaktoren
<u>Nährstoffwerb</u>	
Transferrin bindende Proteine	Eisenerwerb
Siderophor-Rezeptoren	Eisenerwerb
OMP	Bindung von Häm-Produkten
Hämolyse	Zersetzung roter Blutkörperchen (Eisenerwerb)
LPS	Bindung von Häm-Produkten
ABC-Transporter	Aufnahme von Eisen, Kobalt und Nickel
<u>Toxine</u>	
Apx-Toxine (I, II, III, IV)	Hämolyse, Zytolyse, Induktion von Läsionen
LPS	Lyse von Zellen, Interaktion mit Apx-Toxinen
Proteasen	Abbau von porziner Gelatine, Aktin und Hämoglobin
<u>Immunsystemevasion</u>	
Kapsel	Überleben in Makrophagen, Schutz vor dem Komplementsystem
LPS	Überleben in Makrophagen
Exotoxine	Zerstörung von Makrophagen und PMN
Superoxiddismutase	Überleben in Makrophagen
Heat Shock Proteine	Überleben in Makrophagen
Urease	Hemmung B-Zellen, Überleben in Makrophagen
<u>Persistenz</u>	
hlyX-Gen	anaerober Stoffwechsel

### 2.2.1 Adhäsionsfaktoren im unteren Respirationstrakt

Besonders wichtig für die Etablierung einer klinischen Erkrankung ist die Adhäsion von *A. pleuropneumoniae* in der Lunge. Dabei spielen besonders Läsionen durch Exotoxine eine große Rolle, die allerdings erst nach einer erfolgreichen Adhäsion des Erregers in das Gewebe eingebracht werden können. Das Bakterium kann in Form eines Aerosols die Lunge direkt erreichen und sich über die Bindung an Mukus, Proteine und spezifische Zellarten im Atemtrakt etablieren, sich vermehren und gravierende Schäden anrichten (Chiers et al. 2010).

Eine zentrale Rolle spielen dabei von *A. pleuropneumoniae* ausgebildete Fimbrien, die sich allerdings lediglich durch den Zusatz bestimmter Wachstumsfaktoren ausbilden. Boekema et al. (Boekema et al. 2003; Boekema et al. 2004) konnten nachweisen, dass *A. pleuropneumoniae*-Fimbrien vom Typ 4 nur exprimiert werden, wenn Epithelialzellen als Wachstumsfaktor vorhanden sind. Lipopolysaccharide (LPS) wurden ebenfalls als mögliche Adhäsionsfaktoren identifiziert, die in der Adhäsion an die porzinen Trachealringe sowie Bereiche der Lunge beteiligt sind (Bélanger et al. 1990; Bélanger et al. 1994; Paradis et al. 1994; Paradis et al. 1999). Ramjeet et al. (Ramjeet et al. 2005) konnten zeigen, dass bei Veränderung einer bestimmten Core-Region die Fähigkeit zur Adhäsion von *A. pleuropneumoniae* verloren geht. Eine weitere Studie belegt, dass eine Knockout-Mutante mit einem funktionslosen *rfaE*-Gen - verantwortlich für die Biosynthese von LPS - nicht mehr in der Lage ist, an Lungenepithelien zu binden (Provost et al. 2003), womit LPS ein wichtiger Faktor in der Adhäsion von *A. pleuropneumoniae* zu sein scheint.

Weiterhin sind für *A. pleuropneumoniae* zahlreiche verschiedene Membranproteine (OMP) beschrieben, die mögliche Funktionen bei der Adhäsion an den Wirt erfüllen. *A. pleuropneumoniae* kann sich beispielsweise durch ein von Enriquez-Verdugo et al. nachgewiesenes OMP an das Kollagen in Schweinelungen anheften (Enriquez-Verdugo et al. 2004) sowie durch ein weiteres Protein an Fibronectin (Mullen et al. 2008). Ein dem YadA-Adhäsion ähnliches Protein, das in *Yersinia* eines der zentralen Anheftungsproteine darstellt, wurde auch in *A. pleuropneumoniae* nachgewiesen und erfüllt möglicherweise ähnliche Aufgaben bei der Infektion mit *A. pleuropneumoniae* (Chung et al. 2007). Weitere Membranproteine existieren in Form eines 55kDa-Proteins, das an das Alveolarepithel bindet, sowie weiterer möglicher Adhäsine (Baltes et al. 2004; van Overbeke et al. 2002).

Die Kapsel von *A. pleuropneumoniae* erfüllt keine direkte Aufgabe innerhalb der Adhäsion, könnte aber andere Adhäsionsfaktoren maskieren und somit indirekt zur eigentlichen Adhäsion beitragen (Chiers et al. 2010).

Die Produktion eines Biofilms trägt maßgeblich zur Persistenz des Erregers, aber auch zur Kolonisation bei (Kaplan et al. 2004; Kaplan et al. 2005). Verschiedene Biofilm-bildende Stoffe

wurden dabei identifiziert. Erregermutanten ohne diese Fähigkeit hatten eine verringerte Virulenz (Buettner et al. 2008; Dalai et al. 2009; Izano et al. 2007). Weitere Untersuchungen sind allerdings nötig, um die Rolle der Biofilme in der Adhäsion von *A. pleuropneumoniae* vollständig aufklären zu können (Chiers et al. 2010).

### 2.2.2 Beschaffung von Nährstoffen

Die Beschaffung von Nährstoffen stellt für alle Organismen einen essentiellen Faktor zum Überleben dar. Dabei stellt die Besiedelung der unteren Atemwege aufgrund der restriktiven Bereitstellung von Nährstoffen in diesem Milieu ein besonderes Problem dar. *A. pleuropneumoniae* hat sich allerdings über die Lyse verschiedener Zellarten Wege geschaffen, diese Begrenzung zu umgehen. Exotoxine und Lipopolysaccharide spielen dabei eine nicht unerhebliche Rolle.

Alein die Tatsache, dass mehr als 50 Gene von *A. pleuropneumoniae* an der Aufnahme und Verstoffwechslung von Eisen beteiligt sind, zeigt die enorme Relevanz dieses Nährstoffes für den Erreger und dessen Virulenz (Xu et al. 2008). Dabei hat *A. pleuropneumoniae* verschiedene Möglichkeiten an porzines Eisen zu gelangen. Über zwei verschiedene Bindungsproteine (TbpA und TbpB) gelangt Transferrin in die Bakterienzelle, wobei im Fall vom TbpB nachgewiesen werden konnte, dass es in der Lage ist Haemin zu binden (Gerlach et al. 1992). Als Energielieferant für den Membrantransport dient ein Transportproteinkomplex, der sich in der Zellmembran befindet (Moeck et al. 1998) und eine zentrale Rolle in der Eisenbeschaffung und Virulenz von *A. pleuropneumoniae* einnimmt (Baltes et al. 2001; Fuller et al. 2000). Die Rolle von Siderophor-Rezeptoren ist im Detail noch nicht ausreichend geklärt (Chiers et al. 2010; Diarra et al. 1996).

*A. pleuropneumoniae* ist zudem in der Lage Häm-Komponenten wie Häm, Hämin, Hämatin und Hämoglobin zu verstoffwechseln, wobei die roten Blutkörperchen über Hämolsine zersetzt werden (Deneer et al. 1989a; Frey et al. 1993). Die so freigesetzten Komponenten werden sowohl von LPS als auch von OMPs gebunden (Archambault et al. 1999; Bélanger et al. 1995). Weiterhin konnten Chin et al. (Chin et al. 1996) ein ATP-binding-Cassette (ABC)-Transporter-System sequenzieren, das vermutlich die Aufnahme von Eisen ins Zytoplasma reguliert.

Auch für andere essentielle, im Respirationstrakt selten vorkommende Nährstoffe besitzt *A. pleuropneumoniae* Mechanismen, um diese Stoffe zu nutzen. Nickel wird vom Bakterium für die Urease-Aktivität benötigt, die sowohl B-Zellen hemmen kann als auch eine Persistenz in Makrophagen zu vermitteln scheint (Baltes et al. 2001; Klitgaard et al. 2012). Auch die Funktion der Produktion von Ammonium - ein wichtiger Stickstofflieferant für viele Bakterien über die Urease -

wird diskutiert (Bossé et al. 2002b). Für die Aufnahme von Nickel und Kobalt besitzt *A. pleuropneumoniae* ein weiteres ABC-Transporter-System (Bossé et al. 2001), wobei der genaue Mechanismus der Aufnahme noch nicht geklärt ist (Chiers et al. 2010).

Auch Maltose trägt auf noch nicht geklärte Weise zu Virulenz von *A. pleuropneumoniae* bei (Lone et al. 2009a) und wird durch ein OMP aufgenommen (Deneer et al. 1989b). Eine erhöhte Expression der beteiligten Gene wurde besonders bei Kontakt zu bronchoalveolärer Flüssigkeit nachgewiesen (Lone et al. 2009b).

Mullen et al. konnten zudem die Fähigkeit von *A. pleuropneumoniae* aufzeigen, DNA zu binden, und belegen, dass noch andere Wege der Verstoffwechslung von Nährstoffen möglich sind (Mullen et al. 2008).

### 2.2.3 Schädigung des Gewebes

Bezüglich der Virulenz von *A. pleuropneumoniae* spielen die Apx-Toxine eine herausragende Rolle. Sie können das Gewebe nach der Adhäsion von *A. pleuropneumoniae* durch ihre zytotoxische und hämolytische Wirkung schwer schädigen (Frey 1995; Sassu et al. 2017a; Schaller et al. 2000).

Die Apx-Toxine werden den unter gramnegativen pathogenen Bakterien weit verbreiteten RTX-Toxinen („repeats in toxin“) zugeordnet (Frey 1995). Ihre Wirkung können sie entweder direkt durch ihren zytotoxischen und hämolytischen Effekt auf eine Vielzahl von Zellen oder durch die indirekte Stimulation von Phagozyten zu einer erhöhten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und proteolytischen Enzymen aus Phagozyten ausüben (Bossé et al. 2002b; Frey 1995; Haesebrouck et al. 1997). Alle virulenten Serotypen exprimieren mindestens 1 oder 2 der Apx-Toxine (Chiers et al. 2010). Dabei produziert *A. pleuropneumoniae* die Rtx-Toxine ApxI, ApxII, ApxIII und ApxIV (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 - Apx-Toxine von *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Bossé et al. 2002b; Frey 1995; Sassu et al. 2017a)

Toxin	Hämolyse	Zytotoxizität	Serotypen
ApxI	stark	Stark	1, 5a, 5b, 9, 10, 11, 14, 16
ApxII	schwach	Moderat	Alle außer 10 und 14
ApxIII	keine	Stark	2, 3, 4, 6, 8, 15
ApxIV*	Nicht untersucht	Nicht untersucht	Alle

\*Wird nur in vivo produziert

Die Toxine (Apx I-III) sind durch die enge Adhäsion von *A. pleuropneumoniae* an die Lungenzellen in der Lage, direkt an der Zellmembran aktiv zu werden und somit die Zerstörung der Zelle zu bewirken (Chiers et al. 2010). Dabei scheinen neutralisierende Antikörper keine oder nur geringe Auswirkungen auf die Toxine zu haben (Haesebrouck et al. 1997). Sogar das körpereigene Abwehrsystem können die Apx-Toxine zu ihrem Vorteil nutzen. Die Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten durch die Apx-Toxine und LPS führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Sauerstoffradikalen, proteolytischen Enzymen und Zytokinen (Bossé et al. 2002b; Dom et al. 1992c). Besonders der sogenannte „respiratorische Burst“, ausgelöst durch toxische Sauerstoffmetaboliten, der zur Lyse von Bakterien und anderen Pathogenen bestimmt ist, wirkt dabei verstärkt toxisch auf körpereigene Zellen und das umliegende Gewebe (Dom et al. 1992c; Haesebrouck et al. 1997).

Das von Schaller et al. 1999 entdeckte vierte Apx-Toxin (ApxIV) kommt in nahezu allen Serotypen von *A. pleuropneumoniae* vor (Schaller et al. 1999), weshalb es verbreitet für den Nachweis von *A. pleuropneumoniae* genutzt wird (Dreyfus et al. 2004). ApxIV wird ausschließlich in vivo exprimiert und scheint eine große Rolle bezüglich der Ausprägung der Virulenz von *A. pleuropneumoniae* zu spielen (Liu et al. 2009; Schaller et al. 1999). In experimentellen Studien konnte es in nekrotischem Gewebe nachgewiesen werden (Baltes et al. 2004), wobei die Expression des ApxIVA-Gens nach Kontakt zur bronchoalveolären Flüssigkeit erhöht war (Lone et al. 2009a, 2009b).

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien und sind in der Lage, Zellen des Wirtsorganismus zu zerstören. Das aus *A. pleuropneumoniae* freigesetzte LPS kann die Entwicklung schwerer Läsionen innerhalb der Lunge begünstigen, indem es einerseits die Effekte der Apx-Toxine auf Phagozyten verstärken und die Produktion von Zytokinen erhöhen und andererseits durch die direkte Bindung an Toll-like-Rezeptoren (TLR) die für *A. pleuropneumoniae* typischen Nekrosen in Lungenepithelzellen beim Schwein erzeugen kann (Auger et al. 2009; Chiers et

al. 2010). Auch die direkte Bindung von LPS an ApxI und II wurde beschrieben (Ramjeet et al. 2008a). Weiterhin kommt es durch LPS zu einer Aktivierung des Komplementsystems mit weiterer Einwanderung von Makrophagen und PMNs in das betroffene Gewebe, welche eine Vasodilatation und Verengung der Atemwege zur Folge hat (Bossé et al. 2002b). Zusammen mit der Schädigung durch die Apx-Toxine führt die Aktivierung des Komplementsystems, speziell des Gerinnungsfaktors XII, zusätzlich zu Mikrothromben, lokaler Ischämie und weiteren Nekrosen (Bossé et al. 2002b).

Proteasen, die vom Bakterium sezerniert werden, können Gelatin, Aktin und Hämoglobin abbauen und spielen ebenfalls eine Rolle in der Entstehung von Läsionen. Auch hohe Hyaluronidasespiegel in der BALF könnten beteiligt sein (Kahlisch et al. 2009).

#### 2.2.4 Vermeidung des Immunsystems

Die effektive Evasion des Wirtsimmunsystems stellt eine wesentliche Grundlage für die Ausbildung schwerwiegender Erkrankungen dar, wie sie im Fall von *A. pleuropneumoniae* zu beobachten sind. Verschiedene Virulenzfaktoren von *A. pleuropneumoniae* können in unterschiedliche Immunprozesse des Wirtes eingreifen und das Bakterium schützen. Durch die aktive Sezernierung von Proteasen werden die Immunglobuline IgA und IgG in der BALF zerstört (Negrete-Abascal et al. 1994; Negrete-Abascal et al. 1998), wodurch *A. pleuropneumoniae* bis zu 30 Minuten durch die nicht optimal funktionierende Opsonophagozytose in der Flüssigkeit überleben kann (Lone et al. 2009b).

Im unteren Respirationstrakt sind Makrophagen und PMN hauptsächlich für die Phagozytose von Bakterien aller Art zuständig. Makrophagen sind, anders als PMNs, allerdings nicht in der Lage, *A. pleuropneumoniae* zu beseitigen. Die gebildeten Exotoxine ApxI, II und III wirken hierbei durch die Induktion von apoptotischen Prozessen innerhalb von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen letal auf diese Zellen (Chien et al. 2009; Cullen et al. 1994; Dom et al. 1992c; Dom et al. 1992b). Auch in einer nicht zur Lyse der Zellen führenden Dosis können die Toxine Makrophagen in ihrer chemotaktischen und phagozytotischen Wirkung einschränken (Chien et al. 2009). So können die Erreger nach erfolgreicher Phagozytose bis zu 90 Minuten in Makrophagen überleben (Cruisjes et al. 1992) und diese über die Bildung von Exotoxinen lysieren und wieder verlassen. Als weitere Schutzmechanismen des Bakteriums innerhalb von Makrophagen werden Kapsel und LPS als Schutzschicht, eine Kupfer-Zink-Superoxiddismutase zum Schutz vor Sauerstoffradikalen, sogenannte Heat-Shock-Proteine als Schutz für Proteine vor Stresseinwirkung (Fuller et al. 2000) und über die Urease produziertes Ammoniak (Bossé et al. 2000) angesehen. Ammoniak kann die bei Phagozytose-

Prozessen nötige Fusion von Phagosom und Lysosom inhibieren und hebt den pH-Wert innerhalb der Lysosomen an, wodurch die Hydrolaseaktivität verringert wird (Bossé et al. 2000).

Speziell der Serotyp 5a ist durch seine Kapsel resistent gegen die durch das Komplementsystem medierte Zerstörung von *A. pleuropneumoniae* (Ward et al. 1994), wobei fraglich ist, inwiefern diese Resistenz auf alle bekapselten Serotypen übertragbar ist (Rioux et al. 2000).

Als bisher letzte Möglichkeit der Immunevasion kann *A. pleuropneumoniae* einen Biofilm bilden, der als Schutzbarriere die Antikörper von den Antigenstrukturen der Kapsel fernhält und somit eine Opsonierung durch Leukozyten verhindert (Donlan et al. 2002).

### 2.2.5 Persistenz

Um dauerhaft im Wirt überleben zu können, müssen sich Bakterien auf die unterschiedlichen Umweltbedingungen im jeweiligen Umfeld einstellen können. Bei chronischen Verläufen der porcinen Pleuropneumonie kann *A. pleuropneumoniae* innerhalb von nekrotischen Bereichen für längere Zeit überleben (Baltes et al. 2004). Durch die Expression des *hlyX*-Gens als regulatorisch wirkendes Gen werden Enzyme zur anaeroben Atmung im Bakterium produziert; somit ist es *A. pleuropneumoniae* möglich, auch in sauerstoffrestringierten Bereichen zu überleben (Jacobsen et al. 2005). Weiterhin konnten Gene für den Aufbau von Oberflächenstrukturen, die Aufnahme von Nährstoffen, die Aufrechterhaltung des Metabolismus und die akute Reaktion auf Stressoren nachgewiesen werden (Baltes et al. 2007; Sheehan et al. 2003).

## 2.3 Immunreaktion auf die Infektion mit *A. pleuropneumoniae*

Vor allem die angeborene Immunabwehr gilt in Bezug auf den Ausgang einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* als einer der wichtigsten Faktoren und somit auch als möglicher Ansatzpunkt der natürlich vorkommenden Resistenz bei Schweinen (Hoeltig et al. 2009). In zwei Studien von Reiner et al. wurden Quantitative-Trait-Loci unter anderem auf Chromosom 2 entdeckt und IL9 und CD41 als Kandidatengene propagiert, die in die angeborene Immunabwehr durch beispielsweise LPS-Erkennung involviert sind (Reiner et al. 2014a; Reiner et al. 2014b).

### 2.3.1 Angeborene Immunabwehr

Zytokine erscheinen schon sehr früh nach Infektion mit *A. pleuropneumoniae* in der Blutbahn, wirken als Chemoattraktanten und kontrollieren die Expression der Akute-Phase-Proteine (Skovgaard et al. 2010). Dabei scheint besonders das Interleukin-6 (IL-6) als Referenz für die bakterielle Infektion in Schweinen und für die Effektivität der antibiotischen Behandlung von Bedeutung zu sein (Fossum et al. 1998; Lauritzen et al. 2003). In einer Studie von Sovgaard et al. waren zudem die Zytokine IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-8 in *A. pleuropneumoniae* infizierten Schweinen hochreguliert und einige Glyko- und Surfactantproteine herunterreguliert (Skovgaard et al. 2010). Die Akute-Phase-Proteine wie Haptoglobin, C-reaktives Protein und Serum-Amyloid-A waren in infizierten Schweinen ebenfalls erhöht und wurden von einigen Autoren als Biomarker für die Herdengesundheit vorgeschlagen (Gomez-Laguna et al. 2014; Heegaard et al. 1998; Heegaard et al. 2011; Hultén et al. 2003).

Die erste Instanz bei einer Infektion bilden innerhalb der angeborenen Immunantwort neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, die zur Phagozytose und Lyse der Pathogene führen (Liggett et al. 1987; Ondrackova et al. 2013).

Eine weitere wichtige Rolle spielen die antibakteriellen Peptide, die von phagozytotischen Zellen und Epithelzellen exprimiert werden und durch eine Bildung von Poren an der Bakterienmembran zu deren Lyse führen (Ramjeet et al. 2005). Das PR-39- Peptid wird zwar vermehrt von neutrophilen Granulozyten bei einer *A. pleuropneumoniae*-Infektion ausgeschüttet (Gabner et al. 2017), scheint jedoch keine Rolle in der direkten Bekämpfung von *A. pleuropneumoniae* zu spielen (Hennig-Pauka et al. 2006; Hennig-Pauka et al. 2012). Vielmehr scheint das Peptid innerhalb der Pathogenese in Zusammenhang mit der fibrotischen Gewebereparatur zu stehen (Sassu et al. 2017a). Andere Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie Defensin, Lactoferrin und Beta-Defensin 2, scheinen effektiver gegen *A. pleuropneumoniae* zu wirken (Luna-Castro et al. 2014; Yang et al. 2015).

### 2.3.2 Humorale Immunabwehr

Immunglobulin-G-Antikörper vermitteln einen großen Teil des Schutzes nach überstandener Infektion mit *A. pleuropneumoniae* (Bossé et al. 1992). Dabei können Antikörpertiter frühestens 7-14 Tage nach der Infektion der Lunge mit *A. pleuropneumoniae* festgestellt werden. Sie steigen bis 6 Wochen nach der Infektion im Titer an und können mehrere Monate erhalten bleiben (Bossé et al. 1992; Gardner et al. 1991).

Ferkel können maternale Antikörper im Alter von 2-12 Wochen aufnehmen, wodurch sie in der Lage sind, eine höhere Antikörperantwort zu erzielen als Ferkel mit niedrigem Antikörperspiegel (Sjölund

et al. 2011). Theoretisch sind Antikörper auch in der Lage, die Apx-Toxine zu neutralisieren und über eine Opsonierung des Bakteriums die Phagozytose zu beschleunigen (Crujisen et al. 1995). Allerdings führten diese lediglich zu einer Reduktion der klinischen Auswirkungen der Erkrankung. Es ist nicht möglich, den Erreger komplett zu eliminieren; besonders bei einer Kapselbildung des Bakteriums wird dies deutlich erschwert (Inzana 1990; Rycroft et al. 1990). Zudem kann die körpereigene Abwehr selbst bei überstandener Infektion die Persistenz des Erregers kaum verhindern, und zahlreiche Tiere werden zu Dauerträgern (Dubreuil et al. 2000; Haesebrouck et al. 1997). *A. pleuropneumoniae* kann sich aber auch nur in den Tonsillen einnisten, wodurch es zu keinerlei Immunantwort kommt. In dieser Inaktivitätsphase im oberen Respirationstrakt kann der Erreger in subklinisch infizierten Herden nur schwer nachgewiesen werden (Gottschalk 2015; Sassu et al. 2017b).

Für die Verhinderung der Kolonisation im oberen Atemtrakt spielt vor allem IgA eine Rolle, das vermehrt in der Mukosa ausgeschüttet wird und die bakterielle Besiedlung der Schleimhaut verhindern soll (Bossé et al. 1992; Ramjeet et al. 2008b; Rycroft et al. 2000).

### 2.3.3 Zell-assoziierte Immunantwort

Die Zell-assoziierte Immunantwort gegen *A. pleuropneumoniae* scheint nur eine geringe Rolle zu spielen. Wenige Autoren - wie Furesz et al. (1997) - konnten eine zellvermittelte Immunantwort mit einer herausgezögerten Hypersensitivität in Verbindung bringen. In einer weiteren Studie beschreiben Appleyard, Furesz und Wilke einen Unterschied in dem Verhältnis von CD4 und CD8 zueinander bei unterschiedlichen *A. pleuropneumoniae*-Dosen (Appleyard et al. 2002).

Th17-Zellen wurden sogar mit der Ausbildung von Läsionen und Antikörpertitern in Verbindung gebracht (Sassu et al. 2017c).

## 2.4 Bekämpfung

Basis der Bekämpfung von durch *A. pleuropneumoniae* ausgelösten Lungenerkrankungen sind einerseits ein verbessertes Herdenmanagement mit erhöhten Biosicherheitsmaßnahmen zur Unterbrechung der Infektionsketten, andererseits die antibiotische Behandlung der Tiere, sowie eine Meta- und Prophylaxe durch gezielte Vakzination (Cleveland-Nielsen et al. 2002).

Innerhalb der Biosicherheitsmaßnahmen werden zum einen externe Faktoren bekämpft – wie z.B. die mögliche Infektion einer Herde durch die Einstallung erkrankter Tiere sowie durch Erregerübertragung aus der Wildschweinpopulation (Reiner et al. 2010; Sassu et al. 2017a). Interne Faktoren bilden sogenannte Trigger-Mechanismen, die es abzustellen gilt (Klinkenberg et al. 2014). Der Stress der Tiere innerhalb des Aufstallungssystems, zum Beispiel durch eine Veränderung der Gruppenzusammensetzung oder den Transport der Tiere, stellt einen wesentlichen internen Faktor innerhalb des Infektionsgeschehens dar. Weiterhin spielen Umweltfaktoren wie ein zu hoher Ammoniakgehalt der Atemluft eine wichtige Rolle für die lokalen Abwehrmechanismen in der Mukosa des oberen und unteren Atemtraktes (Seedorf 2013).

Impfungen gelten momentan als Mittel der Wahl zur Bekämpfung der Pleuropneumonie beim Schwein, wobei kommerzielle Vakzine als attenuierte Ganzzellvakzine, Subunit-Vakzine, Toxoid-Vakzine oder in Form einer Kombination erhältlich sind (Bossé et al. 2002a; O'Neill et al. 2010; Ramjeet et al. 2008b; van Overbeke et al. 2001). Die zurzeit in Deutschland zugelassenen Impfstoffe sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die Ganzzellvakzine waren die ersten erhältlichen Vakzine. Sie gelten somit als Vakzine der ersten Generation und können die klinischen Symptome vermindern. Sie vermitteln aber keinen ausreichenden Serovar-übergreifenden Schutz und können die Infektion und Verbreitung des Erregers nicht verhindern (Ramjeet et al. 2008b). Zusätzlich ist keine Unterscheidung nach dem DIVA-Prinzip, also zwischen geimpften und erkrankten Tieren, möglich (Buettner et al. 2011).

Die Vakzine der zweiten Generation stellen sogenannte Subunit-Vakzine dar. Sie enthalten rekombinante Proteine wie Apx-Toxide und Membranproteine und verbessern die Kreuzreaktivität (Shao et al. 2010; Thevenon et al. 2014; TUMAMAO et al. 2004). Allerdings können auch sie keinen kompletten Schutz gegen *A. pleuropneumoniae* gewährleisten (O'Neill et al. 2010). Die in der Tabelle aufgeführten Subunit-Vakzine, bestehend aus Apx-III-Toxoid, einem Membranprotein und einem Adjuvans, ist dabei in Europa verbreitet in Gebrauch.

Eine bessere Immunität verschaffen zumindest in experimentellen Studien die attenuierten Lebendvakzine (Maas et al. 2006b; Maas et al. 2006a). Sie versprechen sowohl eine verbesserte

Kreuzimmunität als auch die Unterscheidung von geimpften und nicht geimpften, aber infizierten Tieren über das DIVA-Prinzip („differentiating infected from vaccinated“). In den USA wurde bereits ein solcher Impfstoff auf Basis einer Kapselmutante zugelassen (O'Neill et al. 2010).

Auch der verbreitete parenterale Applikationsweg der meisten Impfstoffe wird kontrovers diskutiert. Wilson et al. (2015) postulieren, dass im Gegensatz zu einer rein systemischen Immunantwort bei einer parenteralen Applikation (Makoschey B. 2015) die lokale Applikation in die Mukosa sowohl eine Immunreaktion innerhalb der Mukosa als auch eine systemische Immunreaktion nach sich zieht.

Da die bisher verfügbaren Impfstoffe keinen absoluten Schutz bieten, erfordert die Bekämpfung der porzinen Pleuropneumonie besonders in akuten Fällen den Einsatz von Antibiotika (Jirawattanapong et al. 2008; Sjölund et al. 2010). Der vermehrte Einsatz ist jedoch unweigerlich mit dem Auftreten von Resistenzen der Bakterien gegenüber den verschiedenen Wirkstoffklassen verbunden, was mehr und mehr zu einem Problem in der Landwirtschaft, aber auch in der Humanmedizin wird (White et. al 2002, Davies 2009). Es sind auch Resistenzen von *Actinobacillus pleuropneumoniae* gegen einige antibiotische Wirkstoffklassen beschrieben (Bossé et al. 2015a; Bossé et al. 2015b; Bossé et al. 2017a; Dayao et al. 2016; Milenko et al. 2008). In Großbritannien wurden lediglich 33 % der Isolate negativ auf Resistenzgene getestet. Dabei zeigten sich insbesondere Resistenzen gegen Tetracycline, Ampicillin, Trimethoprim und Enrofloxacin (Bossé et al. 2017a).

Eine Möglichkeit, den Einsatz von Antibiotika von vornherein zu reduzieren, wäre die Nutzung von Tierpopulationen mit erhöhter genetischer Resistenz gegen *A. pleuropneumoniae*.

Tabelle 3 - In Deutschland zugelassene Impfstoffe für *A. pleuropneumoniae*

Bezeichnung	Zulassungsinhaber	Zulassungsnummer	Zulassungsdatum	Zusammensetzung
Coglapix	CEVA Tiergesundheit GmbH	PEI.V.11731.01.1	12.10.2015	Serotyp 1 +2, Apx-Toxoid I,II,III
Porcilis APP	Intervet Deutschland GmbH	210a/94	02.01.1996	Apx-Toxoid I,II,III, <i>A. pleuropneumoniae</i> OMP
Haepovac	IDT Biologika GmbH	64a/97	23.12.1998	Serotyp 2, inaktiviert
Suivac APP	ChemVet DK A/S, Dänemark	PEI.V.11863.01.1	01.09.2016	Serotyp 2+9 inaktiviert, Serotyp 9 Apx-I-Toxoid, Serotyp 2 + 9 Apx-II-Toxoid, Serotyp 2 Apx-III-Toxoid

## 2.5 Natürliche Krankheitsresistenz

Als Krankheitsresistenz wird im Allgemeinen die angeborene Fähigkeit eines Wirtes bezeichnet, ein Pathogen in seinem Lebenszyklus zu stören und somit die Auswirkungen der aus der Infektion folgenden Erkrankung zu unterbinden bzw. zu minimieren. Dabei treten genetische Resistenzen in allen Spezies vom Menschen über Labor- und Haustiere bis hin zu Nutztieren und auch in allen Pathogenen auf. Grund dafür ist die Koevolution zwischen parasitären Pathogenen und ihren Wirten, ein ständiger Wettstreit zur Erhaltung des Gleichgewichts, der es beiden Spezies ermöglicht zu überleben (Bishop 2010; Khibnik et al. 1997).

Oftmals wird in der Literatur zwischen Resistenz und Toleranz gegen Infektionskrankheiten unterschieden. Als resistent bezeichnet werden dabei Individuen, die keinerlei Kolonisation und somit Vermehrung des Erregers ermöglichen. Toleranz beschreibt eine relative Resistenz, die lediglich die klinischen Auswirkungen der Erkrankung abschwächen, aber keine Infektion verhindern kann (Bisset et al. 1996). Meistens wird jedoch von absoluter und relativer Krankheitsresistenz gesprochen, wobei sich auch eine lediglich relative Krankheitsresistenz innerhalb eines Tierbestandes hochgradig auf die Infektion und Ausscheidung des Erregers auswirken und somit die Folgen erheblich vermindern kann (Davies et al. 2009).

Da es bei nahezu jeder Erreger-Wirt Beziehung potentiell eine genetisch determinierte Krankheitsresistenz gibt, hat die Arbeitsgruppe um Davies et. al versucht, wirtschaftliche, epidemiologische und das Tierwohl bestimmende Faktoren gegeneinander abzuwägen, um zu definieren, welche Infektionskrankheiten am ehesten auf eine natürliche Krankheitsresistenz und deren potenzielle Nutzbarmachung untersucht werden sollten. Dabei wurde besonderer Wert auf endemisch auftretende Infektionskrankheiten mit großen Auswirkungen auf die wirtschaftlichen Parameter und das Tierwohl gelegt (Davies et al. 2009).

Krankheitsresistenzen sind in allen großen Nutztierspezies bekannt. Besonders früh wurden Resistenzen innerhalb der Geflügelzucht kommerziell gegen die Marek'sche Krankheit sowie die aviäre Leukose verwandt (Cole 1968). Bei Schafen gilt die Resistenz gegen Magen-Darm-Nematoden besonders in bestimmten Regionen Afrikas als unverzichtbar, bedingt durch die dort vermehrt auftretenden Resistenzen gegenüber Antiparasitika (Stear et al. 1998). Im Rinderbereich wird besonders in Skandinavien an Resistenzen gegenüber Mastitiden geforscht (Heringstad et al. 2000). Weiterhin sind natürliche Resistenzen gegenüber Paratuberkulose, der Infektion mit inneren Parasiten wie Trypanosomen und gegen den verehrten Befall mit externen Parasiten wie Zecken bekannt (Morris 2007). Besonders in Nutztierbereichen, in denen die Herdengesundheit eine herausragende Rolle spielt, erscheinen genetische Resistenzen als adäquates und wichtiges Mittel gegen wirtschaftliche Schäden und für einen gesunden Bestand. In der Lachszucht werden bereits

Resistenzen gegenüber der infektiösen Pankreasnekrose (IPN) oder *Vibrio salmonicida* innerhalb von Zuchtprogrammen verwendet (Gjedrem 2015). Natürliche Resistenzen sind natürlich auch innerhalb der Spezies Schwein vertreten. Aktuell wurde ein relevanter Rezeptor für die Etablierung von dem Porzinen Respiratorischen Reproduktions Syndrom Virus (PRRSV) von Lunney et al. (Lunney et al. 2016) entdeckt und eine entsprechende Resistenz in Tiermodellen bestätigt. Bereits kommerziell als Marker genutzt wird die Resistenz gegen F18-Fimbrien tragende *E.coli* (Meijerink et al. 1997).

Besondere Probleme bei der genetischen Aufarbeitung von natürlichen Resistenzen bestehen in Bezug auf Erkrankungen, deren zugehörige Resistenzen nur durch das Zusammenspiel mehrerer Gene zu erklären sind. Es werden polygene Resistenzen hinter vielen bekannten Erkrankungen beim Menschen - wie zum Beispiel Multipler Sklerose (Lvovs et al. 2012) - vermutet, wobei verschiedene einzelne Gene für die Ausprägung einer Resistenz verantwortlich sind. Auch in verschiedenen Nutztierspezies werden polygene Resistenzmodelle vorgeschlagen, um die fehlende Heritabilität erklären zu können (Bishop et al. 2014). Somit erscheint es wichtig, alle Umweltfaktoren innerhalb von Studien, die polygene Resistenzen aufdecken sollen, systematisch auszuschließen (Reiner 2009).

## 2.6 Krankheitsresistenz beim Schwein

Da das Schwein sowohl in Deutschland als auch im Rest der Welt eine große Rolle als Nutztier einnimmt, spielt die Gesunderhaltung der Bestände eine herausragende Rolle. Die häufig auf engem Raum gehaltenen Tiere werden innerhalb eines klar definierten und außerordentlich labilen Hygienestatus gehalten, der bereits beim Eintrag von einigen wenigen Pathogenen nicht mehr gewährleistet werden kann. Für die Entstehung von Erkrankungen müssen die Erregermengen Schwellenwerte überschreiten. Resistenter Schweine, ganz gleich, ob diese nun absolut resistent (es kommt nicht zur Infektion) oder nur relativ resistent oder tolerant (die Infektion findet statt, Erregervermehrung- und Ausscheidung sowie Schäden am Tier bleiben jedoch eng begrenzt) wären, würden die Erregervermehrung und deren Ausscheidung reduzieren. Damit entstünden keine oder nur noch marginale Krankheitsbilder und eine verbesserte Hygiene in und zwischen den Beständen, sodass die kritischen Schwellenwerte zum Krankheitsausbruch nicht mehr überschritten würden (Reiner G 2003).

Eine Möglichkeit, stabilere Schweine zu erzeugen, könnte die Selektion von Tieren mit einer erhöhten allgemeinen Immunkompetenz darstellen. So könnten eventuell gleich mehrere Erregergruppen erfolgreich abgewehrt werden.

Bereits im Jahre 1994 gelang es einer Forschergruppe um Edfors-Lilja (Edfors-Lilja et al. 1994), innerhalb einer Population von Yorkshire-Schweinen genetische Unterschiede bezüglich der Leukozytenzahl und phagozytären Kapazität nachzuweisen. Die höchsten Heritabilitäten zeigte dabei die Gesamtzahl an polymorphkernigen Leukozyten ( $h^2=0,87$ ). Für die phagozytäre Kapazität und die Produktion von IL-2 wurden Heritabilitäten von 0,2 – 0,3 geschätzt. Es wurde also geschlussfolgert, dass diese untersuchten Immunparameter potentiell zur Verwendung als genetische Marker für Immunkompetenz geeignet seien. Weiterhin war es innerhalb von Selektionsprogrammen von Mallard und Wilkie (Mallard et al. 1992) durch die Selektion von Tieren mit stärker und schwächer ausgeprägter Immunantwort nach Impfung möglich, züchterisch eine gesteigerte Immunantwort zu erzielen und die Tageszunahmen zu verbessern. Solche Zuchtprogramme werden seither in Kanada genutzt (Reiner G 2003). Innerhalb der Toll-like-Rezeptoren (TLR)-Gruppen wurden ebenfalls Faktoren für die allgemeine Krankheitsanfälligkeit beim Schwein erforscht und identifiziert. Shinkai et al. (Shinkai et al. 2006) konnten SNPs in TLR-1-6 nachweisen, und Yang et al. (Yang et al. 2012) beschrieben einen interessanten Polymorphismus im TLR-4-Gen in Verbindung mit der allgemeinen Immunkompetenz. Ein weiterer potentieller Marker innerhalb der allgemein verstärkten Immunantwort ist das *NRAMP1* („natural resistance-associated macrophage protein 1“) (Ding et al. 2014). Die Arbeitsgruppe entdeckte einen SNP, der mit Merkmalen wie Leukozytenzahl und dem Gehalt an Zytotoxin in Monozyten korrelierte. Ein weiteres vielversprechendes Kandidatengens stellt das *NOD1*-Gen („nucleotide-binding oligomerization domain 1“) dar. Innerhalb der für die Erkennung und Bindung mikrobieller Strukturen verantwortlichen Genregion fanden sich 2 SNPs (Shinkai et al. 2015). Eine genomweite Assoziationsstudie identifizierte 32 SNPs, die signifikant mit der allgemeinen Immunkompetenz über Interferon-gamma, Interleukin-10 sowie dem Verhältnis dieser beiden Parameter zueinander und zu Immunglobulin-G assoziiert sind (Lu et al. 2013).

Auch in Bezug auf die allgemeine Immunabwehr innerhalb der Lunge wurden Marker beschrieben, die es dem Tier ermöglichen, sich effizienter gegen auf das Milieu der Lunge spezialisierte Erreger zu verteidigen. Eine besondere Rolle spielt hierbei das *Swine-Leukocyte-Antigen* (SLA), welches einen Histokompatibilitätskomplex (MHC) darstellt und diverse Immunparameter beeinflusst, die unter anderem auch bei der Impfantwort eine wichtige Rolle spielen (Gao et al. 2014). Das *Surfactant-associated-Protein* konnte mit der Variation allgemeiner Lungenschädigung in Verbindung gebracht werden (Zhang et al. 2015).

## 2.6.1 Krankheitsresistenz gegenüber Parasiten

Natürliche Resistenzen gegen Parasiten wurden bereits 1978 von Wakelin et al. (Wakelin 1979) gegenüber *Strongyloides* und *Ascaris suum* vermutet. Die vermuteten Resistenzen gegenüber *Ascaris suum* wurden inzwischen bestätigt und verantwortliche QTL wurden identifiziert (Skallerup et al. 2012). Die resistenteren Tiere waren nicht nur resistent gegenüber *Ascaris suum*, sondern auch gegenüber *Trichuris suis*. Weitere Resistenzen wurden gegenüber *Trichinella spiralis* aufgedeckt, wobei hierbei primär Gene des MHC-Komplexes für eine verbesserte Abwehr gegenüber Muskelarven vermutet wurden (Lunney J. K., Murrel K.D. 1988; Madden et al. 1990). Weitere Resistenzen wurden bezüglich der Infektion mit Zestoden wie *Taenia solium* beschrieben (Sciutto et al. 2003). Innerhalb der Gruppe der Apikomplexa konnten Reiner et al. (Reiner et al. 2002; Reiner et al. 2007) Resistenzunterschiede zwischen den Rassen Piétrain und Meishan aufzeigen. Piétrain-Schweine zeigten demnach auffälligere klinische Symptome sowie eine 20-fach höhere Menge der jeweiligen Parasitenstadien in ihrer Muskulatur. Aufgrund von QTL-Studien wurden Kandidatengene im MHC-Komplex sowie innerhalb der Immunglobulin-Familie vermutet.

## 2.6.2 Krankheitsresistenz gegenüber Viren

### 2.6.2.1 PRRSV

Das Virus des Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndroms wurde erst im Jahre 1987 in Amerika und Europa entdeckt und gilt aufgrund ausgeprägter ökonomischer Verluste als eines der wichtigsten Viren in der kommerziellen Schweineproduktion (Holtkamp et al. 2013). Im Jahre 1998 wurden zum ersten Mal Resistenzunterschiede zwischen Schweinen der Rassen Meishan und Duroc nachgewiesen (Halbur et al. 1998). Schweine der Rasse Duroc zeigten einen höheren Grad an durch PRRSV induzierten Lungenläsionen sowie verringerte Tageszunahmen und erhöhte Antikörpertiter. Unterschiedliche Auswirkungen der Viruserkrankung auf das Reproduktionsgeschehen, speziell auf die Abortrate, konnten mit Interferon- $\gamma$  in Verbindung gebracht werden (Lowe et al. 2005). Weitere Anhaltspunkte zum genetisch Hintergrund verschiedener Schweinepopulationen bezogen auf die PRRSV-Infektion konnten Studien von Petry et al. (Petry et al. 2007), Vincent et al. (Vincent et al. 2005, 2006) und Doeschl-Wilson et al. (Doeschl-Wilson et al. 2009) aufdecken. Es wurden Unterschiede unter anderem in Bezug auf die generelle Leistung der Tiere (Tageszunahmen), die Ausbildung und Auswirkung von Lungenläsionen, den Virustiter und verschiedene immunologische

Parameter festgestellt. In einer Studie von Ait-Ali et al. (Ait-Ali et al. 2007) wurden Makropagen von Landrasseschweinen beschrieben, die eine Resistenz gegenüber PRRSV-Infektion aufwiesen. Als Ursache wurden die CD169-Rezeptoren und IL-8-Spiegel diskutiert. Aufbauend auf diesen Hinweisen auf genetisch verankerte Resistenz wurden QTL-Analysen und genomweite Assoziationsstudien mit Hilfe von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) durchgeführt, die mit den einzelnen Phänotypen wie Lungenläsionen oder Tageszunahmen nach PRRSV-Infektion korreliert wurden (Boddicker et al. 2012; Boddicker et al. 2014a). Ergänzend wurden Expressionsstudien durchgeführt, um die Liste der Kandidatengene einzugrenzen (Schroyen et al. 2015). Dabei konnten über 30 QTL verteilt auf 11 Chromosomen entdeckt werden. Ein QTL auf Chromosom 4 konnte bis zu 16 % der genetischen Varianz bezogen auf die Virusmenge im Tier erklären - bei einer Heritabilität von 0.30 (Boddicker et al. 2012). In diesem Zusammenhang konnte das Interferon-induzierte *Guanyl-bindende Protein 5* (GBP5) als wichtiges Kandidatengen identifiziert und über mehrere Studien validiert werden (Boddicker et al. 2012; Boddicker et al. 2014a; Boddicker et al. 2014b). Ein weiteres wichtiges Kandidatengen wurde innerhalb des CD163-Rezeptors, eines möglichen Rezeptors auch für das PRRSV, das Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASFV) und das Simian- haemorrhagic-Fever-Virus (SHFV), vermutet (Calvert JG et al. 2007), nicht zuletzt aufgrund seiner bereits bekannten Funktion als Bindungs- und Internalisierungsmediator des Virus der Afrikanischen Schweinepest (ASFV) (Sánchez-Torres et al. 2003) und Simian-haemorrhagic-Fever-Virus (SHFV) (Cai et al. 2015). Die Resistenzmediation durch das CD163-Gen wurde schlussendlich durch die Versuche von Prather et al. (Prather et al. 2013) und Whitworth et al. (Whitworth et al. 2015) bestätigt, die mittels Genschere (CRISPR/Cas) Ferkel ohne den jeweiligen Rezeptor CD163 oder CD169 erzeugten und mit PRRSV infizierten. Ohne CD163 konnten die Ferkel nicht infiziert werden; sie entwickelten weder klinische Anzeichen noch Lungenläsionen.

#### 2.6.2.2 PCV2

Natürliche genetische Krankheitsresistenz wurde auch in Bezug auf Infektionen mit dem Porzinen Circovirus Typ 2 (PCV2) vermutet und durch Lopez-Soria et al. (López-Soria et al. 2004) anhand der Mortalität nach dem Absetzen im Vergleich verschiedener Kreuzungsrassen (Large White x Duroc und Large White x Piétrain) und reinrassiger Schweine der Rasse Piétrain nachgewiesen. Auch Resistenzunterschiede bezüglich klinischer Symptomatik und histologischer Läsionen zwischen Duroc und Large White wurden vorgestellt (Opriessnig et al. 2006). Beim Vergleich der Immunglobulin-Spiegel (IgG, IgM), der Antikörperbildung und Serokonversion sowie der Virusmenge im Blut zwischen Landrasse und Piétrain (Opriessnig et al. 2009) ergaben sich Unterschiede im Grad der Läsionen, der PCVD-spezifischen pathohistologischen Aberrationen und der Höhe der Antikörperspiegel.

### 2.6.2.3 *Pseudorabies (PRV)*

Die Arbeitsgruppe um Rothschild begann bereits 1984, die humorale Immunantwort auf PRV-Vakzine zu untersuchen, wobei die Wirkung der Vakzine unter der Wirkung der Immunantwort zwischen verschiedenen Rassen unterschiedlich ausfiel (Rothschild et al. 1984). In einer nachfolgenden Studie wurden Serum-Antikörpertiter von Rhinitis-atrophicans-Vakzinen und PRV-Vakzinen in einer Kreuzungsstudie mit drei Rassen verglichen (Meeker et al. 1987a, 1987b). Es wurden Heritabilitäten von 0,18 berechnet und geschlussfolgert, dass eine verbesserte Immunantwort durch gezielte Selektion zu erreichen sei. Das Virus war zudem das erste virale Pathogen beim Schwein, für das die molekulare Basis von Resistenzunterschieden in Form von QTL kartiert wurde (Reiner et al., 2002). Dabei wurden zunächst Resistenzunterschiede zwischen reinrassigen Schweinen der Rassen Meishan und Piétrain nachgewiesen und anschließend die verantwortlichen chromosomalen Regionen durch Infektion, Phänotypisierung und Genotypisierung von 89 F2-Kreuzungstieren mit 85 Mikrosatellitenmarkern kartiert. Signifikante QTL für neurologische Symptome wurden auf den Chromosomen 5, 6, 9 und 13 identifiziert. Sie erklärten bis zu 18 % der phänotypischen Varianz. Auch QTL für die Rektaltemperatur nach Infektion wurden kartiert. Andere Arbeiten zeigten den Zusammenhang zwischen Leukozyten-Antigenen („swine leukocyte antigen“, *SLA*) innerhalb von PK15-Epithelzellen und dem Ausmaß der PRV-Infektion mit Hilfe von Expressionsstudien (Flori et al. 2008b; Flori et al. 2008a).

### 2.6.2.4 *Afrikanische Schweinepest*

Resistenzen gegenüber dem Virus der Afrikanischen Schweinepest wurden besonders in Warzenschweinen im Vergleich zum Hausschwein beobachtet, wobei die effizientere Zerstörung und der Abbau von infizierten Makrophagen als Resistenzmechanismus diskutiert wird (C. A. L. Oura et al. 1998; Martins et al. 1993). Im Zuge der Resistenzentwicklung wurde vom Roslin-Institut in Großbritannien bereits versucht, diese Resistenz in Schweinen - dem sogenannten „pig26“ - zu nutzen und somit einen ersten Schritt zu resistenten Schweinen zu wagen (Lillico et al. 2013). Dabei wurden bereits von einigen Autoren mögliche Kandidatengene innerhalb des Erregers der Afrikanischen Schweinepest vorgeschlagen. Besonders immunmodulatorische Faktoren wurden hierbei berücksichtigt und identifiziert, wie beispielsweise CD2 (8-DR/CD2v) (Borca et al. 1998), IAP (A224L) (Nogal et al. 2001), *BCL-2* (*A179L*; *5-HL*) (Afonso et al. 1996) und *IκBα* (*A238L* 5-EL) (Powell et al. 1996; Tait et al. 2000). Besonders das *A238L* zeigt große Gemeinsamkeit mit der Sequenz des *IκBα* (*NFKBIA*) vom Hausschwein und kann an den RELA-Rezeptor (*p65*; v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A) binden und somit immunsuppressiv agieren. Eine Arbeit von Palgrave et al.

(2011) konnte eine Variation im RELA-Gen entdecken und spekuliert, dass durch den fehlenden immunmodulatorischen Effekt von *A238L* durch die Interaktion mit dem RELA-Rezeptor der phänotypische Unterschied zwischen den als resistent geltenden Warzenschweinen und Hausschweinen erklärt werden könnte. Der Arbeitsgruppe um Lillico et al. gelang es schließlich, ein Allel des RELA-Gens vom Warzenschwein erfolgreich in das Genom von Large-White-Embryonen einzubringen und zudem lebende Ferkel zur Welt zu bringen (Lillico et al. 2016).

## 2.6.3 Krankheitsresistenz gegenüber Bakterien

### 2.6.3.1 *E. coli*

Das Paradebeispiel für Resistenz gegen Infektionserreger ist die Resistenz gegen F18-Fimbrien tragende *Escherichia (E.) coli*, die Erreger der Ödemkrankheit beim Schwein. Die Erfolgsstory liegt im Hauptgencharakter des Rezeptors, der daher schon früh auf Chromosom (SSC) 6 nicht weit entfernt vom Halothan-Locus nachgewiesen werden konnte (Vögeli et al. 1996). Der F18-Rezeptor-Locus wurde später mit den Fucosyltransferase-Genen (*FUT1* und *FUT2*) in Verbindung gebracht (Meijerink et al. 1997). Ein SNP innerhalb vom *FUT1*-Gen auf der Position 307 konnte durch weitere Untersuchungen von Meijerink et al. (Meijerink et al. 2000) präzisiert und als funktioneller SNP charakterisiert werden. Zur Nutzung in der Selektion steht ein Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP-PCR) zur Verfügung (Meijerink et al. 2000).

Auch bezüglich Durchfallerkrankungen bei Saugferkeln und abgesetzten Schweinen bedingt durch F4-Fimbrien-tragende *E. coli* werden phänotypisch schon lange Resistenzunterschiede beschrieben (Smith et al. 1968; Sweeney 1968). Dabei spielte besonders die Adhäsion enterotoxischer (ETEC) *E.coli*-Stämme an die Darmschleimhaut des Wirtsorganismus eine wichtige Rolle. Sie erfolgt meist über Fimbrien, die sich innerhalb der unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkte des Schweins in ihrer Ausprägung unterscheiden. Stämme, die hauptsächlich F4-, F5-, F6- und F41-Fimbrien exprimieren, kommen vermehrt in der neonatalen Entwicklungsphase vor, F18- und AV24-Fimbrien dominieren hingegen in der Phase nach dem Absetzen der Ferkel von der Sau (Fairbrother et al. 2005; Nagy et al. 2005).

Ein Großteil der Stämme, die an der neonatalen Diarrhö beteiligt sind, tragen die F4-Fimbrien (ØRSKOV et al. 1964). Rezeptoren, die die Bindung von diesen *E.coli*-Stämmen an der Darmschleimhaut gewährleisten, wurden in Form von F4ac-, F4ab- und F4ad-Rezeptoren beschrieben, wobei die Anzahl der Loci, die die einzelnen Rezeptoren kodieren, noch nicht geklärt sind (Bertschinger et al. 1993; Gibbons et al. 1977; Hu et al. 1993; Sellwood 1982; Zhang et al. 2008). Es konnten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) innerhalb von Muzin-Genen (*MUC4* und *MUC13*) identifiziert werden, die sich im Kopplungsungleichgewicht mit den F4ab- und F4ac-Loci befinden und somit als mögliche genetische Marker in Frage kommen (Peng et al. 2007; Rampoldi et al. 2011; Zhang et al. 2008).

### 2.6.3.2 *Salmonella*

Resistenzen gegenüber der Salmonellose, speziell dem wenig wirtsspezifischen Serovar *Typhimurium*, wurden besonders im Mausmodell hinreichend erforscht und nachgewiesen, wobei eine häufige Assoziation mit dem sogenannten *Natural-Resistance-associated-Macrophage-Protein-1* (*NRAMP1*) entdeckt wurde (Skamene et al. 1982; Vidal et al. 1995). In Schweinen wurden unterschiedliche cDNA-Sequenzen im *NRAMP1*-Gen publiziert (Tuggle et al. 1997; Zhang et al. 2000), wobei das Gen auch in Schweinen mit einer Immunmodulation und Durchfallerkrankungen beim Ferkel (Dai et al. 2017; Zhao et al. 2012) korreliert. Es wurde weiterhin gezeigt, dass nach einer Infektion mit *S. typhimurium* und *S.choleraesuis* Toll-like-Rezeptoren (*TLR5* und *TLR9*) hochreguliert wurden (Burkey et al. 2007). Durch weitere Expressionsstudien konnte außerdem ein SNP im *CCT7*-Gen entdeckt werden, das ebenfalls nach Infektion mit *S. typhimurium* hochreguliert wird (Uthe et al. 2009).

### 2.6.3.3 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Die natürliche Krankheitsresistenz gegen das Bakterium *A. pleuropneumoniae* wurde bereits in einigen Studien beschrieben (Jones 1969; Straw et al. 1983), wobei die genetische Basis von der Arbeitsgruppe Hoeltig et al. (2008, 2009) durch gezielte Infektionsstudien aufgezeigt wurde. Die größten Resistenzunterschiede zeichneten sich dabei zwischen Schweinen einer Hampshire-Linie und der Rasse Piétrain ab. Dabei waren die Piétrain-Schweine am anfälligsten. Das wichtigste Ergebnis der Studie war jedoch die Aufspaltung in empfindliche, resistente und intermediäre Tiere innerhalb von Würfen der Deutschen Landrasse. Diese legte den Grundstein für die Aufklärung der molekularen Basis dieser Resistenzunterschiede beim Schwein. Eine weitere Voraussetzung für solche Studien war allerdings eine exakte Infektion der Versuchstiere und eine sehr genaue klinische Bonitur. Beides wurde an der Stiftung Tierärztliche Hochschule in Hannover entwickelt und führte unter Einbeziehung klinischer, radiologischer und sonographischer Parameter zum „Respiratory

Health Score“ (RHS) (Hoeltig et al. 2009). Weitere Studien konnten die unterschiedliche Empfänglichkeit der genannten Schweinerassen weiter untermauern und ergaben erste Hinweise auf beteiligte Pathways und Kandidatengene (Benga et al. 2009; Kahlisch et al. 2009). Das Akute-Phase-Protein Haptoglobin, sowie *Fetuin-A* zählten hierzu. Bestimmte Transferrin-Genotypen waren in der Deutschen Landrasse mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert (Daniłowicz et al. 2010). An segregierenden F2-Schweinen aus Hampshire-DL-Kreuzungen konnte der genetische Anteil an der Resistenz mit Hilfe einer QTL-Studie bestätigt werden. Dabei wurden 7 signifikante QTL auf den Chromosomen SSC 2, 6, 12, 13, 16, 17 und 18 kartiert (Reiner et al. 2014a). Besonders zwei Marker auf Chromosom 2 und 12 konnten mit perakuten Todesfällen nach *A. pleuropneumoniae*-Infektion und höheren Pneumoniegraden assoziiert werden. Einzelne QTL erklärten bis zu 20 % der phänotypischen Varianz. Innerhalb von früheren QTL-Studien zur dorso-kaudalen chronischen Pleuritis innerhalb von über 7400 Mastschweinen von der Arbeitsgruppe um Gregersen et al. (2010) konnten zudem QTL auf SSC 8 und 14 entdeckt werden. Die QTL auf SSC 2, 12, 13 und 18 konnten von beiden Arbeitsgruppen nachgewiesen werden. Eine Expressionsstudie lieferte zusätzliche Hinweise auf Kandidatengene, unter anderem *Transferrin*, *Haptoglobin* und *CD14* (Reiner et al. 2014b). Damit ist die genetische Komponente der Resistenz gegenüber *A. pleuropneumoniae* belegt. Allerdings ist keine der bislang angewandten Methoden in der Lage, funktionelle Genvarianten zu entdecken und für die Selektion auf resistenterer Schweine nutzbar zu machen. Die Problematik liegt insbesondere in zu geringen Tier- und Markerzahlen und der genetischen Struktur von F2-Familien, die geprägt ist durch extrem große Kopplungsgruppen. Große Tierzahlen zu untersuchen ist nach wie vor kaum umsetzbar (Finanzierung, Tierschutz). Eine erhebliche Ausweitung an Genmarkern ist jedoch inzwischen durch Genotyping-by-Sequencing (GBS) machbar (Brouard et al. 2017). Durch die Sequenzierung ganzer Genome in niedriger Abdeckung lassen sich einige tausend bis mehrere Millionen Genmarker (SNPs) etablieren, die auch funktionelle Genvarianten abdecken (Daetwyler et al. 2014). Die Problematik der F2-Familie kann mit Hilfe der segregierenden DL-Population überwunden werden.

## 2.7 Genomweite Assoziationsstudie

### 2.7.1 Quantitative-Trait-Locus

Innerhalb der Tierzucht spielt genetischer Fortschritt, besonders innerhalb bestimmter Leistungsparameter, eine große Rolle. Die selektierten Merkmale sind jedoch nur selten qualitative (ja – nein), sondern meistens quantitativ, also mit allmählichen Übergängen ausgeprägt.

Ein quantitatives Merkmal stellt dabei eine messbare phänotypische Variation dar, die durch das Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Einflüssen entsteht. Klassische Beispiele für quantitative Merkmale sind Größe, Gewicht, Milchleistung, Magerfleischanteil und Fiebergrad nach Infektion. Genorte (Loci), die diese Merkmale bestimmen beziehungsweise beeinflussen, sind häufig zahlreich. Sie werden „Quantitative-Trait-Loci“ (QTL) genannt (Complex Trait Consortium, 2007). Um nun diese polygenetischen Merkmale näher zu benennen und in Zusammenhang mit den jeweiligen Phänotypen zu bringen, war lange Zeit die QTL-Analyse das Mittel der Wahl. Aus einer noch stark begrenzten Anzahl an möglichst gleichmäßig über das Genom verteilten Genmarkern, die für die extremsten Phänotypen charakteristische Allele aufwiesen, wurde mittels statistischer Verfahren im cM-Abstand (ein Genom umfasst beim Schwein ca. 2300 cM) die Herkunft aller Chromosomenabschnitte von F2-Kreuzungen aus den Extremen geschätzt. Anschließend wurden für alle 2300 Positionen die Regressionen zum Phänotyp (z.B. Fiebergrad nach standardisierter Infektion) berechnet. Chromosomenbereiche mit signifikanter Assoziation zum Phänotyp werden als QTL bezeichnet. (Geldermann et al. 1996; Lynch et al. 1998). Umwelteinflüsse wurden weitgehend gleichgeschaltet, um die Entdeckung der Genorte nicht zu vereiteln. (Falconer et al. 1996; Haley CS et al. 1997). Die in zahlreichen Studien entdeckten QTL sind in Datenbanken (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>) verzeichnet. Dabei sind QTL für alle wichtigen Nutztierspezies wie Rind, Schwein, Schaf und Geflügel vorhanden. Es sind zur Zeit (2019) 122893 QTL aus 941 Publikationen und 624 verschiedenen Merkmalen im Rind bekannt, 29045 QTL aus 657 Publikationen über 678 verschiedene Merkmale im Schwein und 11141 QTL aus 305 Publikationen über 408 verschiedenen Merkmalen im Geflügel. Die Merkmale umfassen hierbei sowohl wirtschaftlich interessante Merkmale, wie fettfreie Muskelmasse (Lean muscle mass), Fruchtbarkeit oder Bestandteile der Milch, aber auch krankheitsrelevante Merkmale, wie zum Beispiel QTL in Zusammenhang mit Resistenz gegen A. pleuropneumoniae (Reiner et al. 2014a; Reiner et al. 2014b).

Der größte Nachteil von QTL-Studien ist, dass im Bereich identifizierter QTL mehrere hundert Kandidatengene lokalisiert sind und nicht ohne Weiteres auf das funktionelle Nukleotid (QTN) geschlossen werden kann (Korte et al. 2013).

### 2.7.2 Referenzsequenzen und GWAS

Mit der Fertigstellung der Sequenzierung des Humangenoms 2003 (International Human Genome Sequencing Consortium 2004) wurden neue Möglichkeiten bezüglich der Etablierung genetischer Unterschiede zwischen Menschen aufgedeckt. Das HapMap-Projekt wurde gegründet, um diese genomweiten Unterschiede in einer Datenbank zusammenzufassen. Diese Datenbank sollte wissenschaftliche Informationen bereitstellen, die genetische Studien mit klinischen Phänotypen als Grundlage erlauben (International HapMap Consortium 2003), und somit die Anfänge der genomweiten Assoziationsstudien begründet haben. Im Jahr 2002 konnte die Arbeitsgruppe um Ozaki et al. (Ozaki et al. 2002) ein Gen, das mit der Empfänglichkeit gegenüber der Infektion des Myokards assoziiert ist, postulieren und somit die erste genomweite Assoziationsstudie (GWAS) der Welt durchführen (Thomas et al. 2005). Infolgedessen kam es zu einem bis heute anhaltenden „Goldrausch“ (Topol et al. 2007) innerhalb der Genetik, nicht zuletzt bedingt durch die prinzipiell einfache Durchführbarkeit der GWAS.

Basierend auf der DNA von Patienten, die jeweils den gewünschten Phänotyp zeigen („case, control“) wird eine Vielzahl von Markern benötigt, die häufig über das gesamte Genom verteilt vorkommen. Besonders geeignet sind hierbei Single- Nucleotide-Polymorphisms (SNPs), also Einzelnukleotidpolymorphismen, die zwar im Gegensatz zu den in QTL-Studien verwendeten Mikrosatelliten einen geringeren Informationsgehalt besitzen, aber viel häufiger im Genom vorkommen (Evans et al. 2004). Über kommerzielle Systeme (zum Beispiel von Illumina) werden die SNPs sequenziert (entweder eine begrenzte Anzahl über einen SNP-Chip oder mittels „Genotyping-by-Sequencing“ (Brouard et al. 2017)) und im Anschluss über eine statistische Auswertung mit den Phänotypen assoziiert (siehe Abbildung 1).

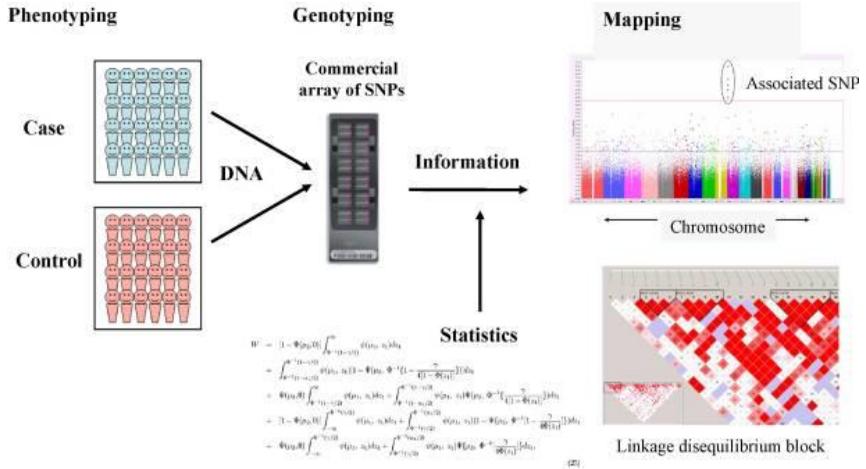


Abbildung 1 - Schematische Darstellung des theoretischen Ablaufs einer genomweiten Assoziationsstudie. (Quelle: (Ikegawa 2012))

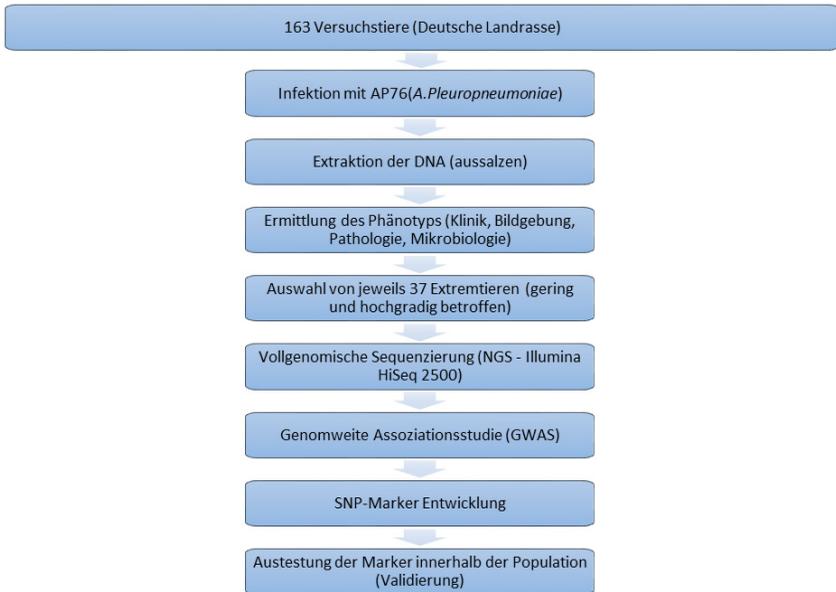
Auch im Bereich der Nutztiere markierte die Fertigstellung und Veröffentlichung des jeweiligen Referenzgenoms den Start der genomweiten Assoziationsstudien. Dabei wurden unter anderem bereits die Genome vom Rind (Eck et al. 2009), Schwein (Groenen et al. 2012; Zimin et al. 2009), Schaf (Jiang et al. 2014), Pferd (Wade et al. 2009), Huhn (Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution 2004) und der Regenbogenforelle (Berthelot et al. 2014) veröffentlicht, und es wird laufend an einer Verbesserung der Sequenzen gearbeitet. Ein überarbeitetes Referenzgenom vom Schwein wurde erst im Jahr 2017 veröffentlicht (Sus scrofa 11.1, GenBank Assembly ID: GCA\_000003025.6).

Ähnlich wie QTL-Studien werden und wurden genomweite Assoziationsstudien im Bereich der Nutztiere häufig für Zuchtparameter genutzt (Abo-Ismael et al. 2017). Dennoch werden genomweite Assoziationsstudien, analog zu den Assoziationsstudien innerhalb der Humangenetik, vielfach für die Aufdeckung genetischer Resistenzen gegen wirtschaftlich bedeutende Erkrankungen wie die bovine Tuberkulose (Bermingham et al. 2014), die Newcastle-Krankheit beim Huhn (Saelao et al. 2019) und dem Porzinen Reproduktivem und Respiratorischen Syndrom Virus (Boddicker et al. 2014a; Whitworth et al. 2015) in Schweinen genutzt, um resistente Nutztiere zu schaffen, die in der heutigen Zeit mit ihrer Tendenz zur restriktiven Antibiotikagabe gegenüber Schlüsselkrankheiten geschützt sind. Etablierte Resistenzmarker können künftig innerhalb von Zuchtprogrammen eingesetzt werden, um Resistenzen innerhalb von Populationen zu etablieren. Dabei können sowohl der klassisch-

züchterische Weg über genomische Selektion als auch die Geneditierung (CRISPR/Cas) in Nukleustieren eingesetzt werden.

### 3 Material und Methoden

Nachfolgend ist der Ablauf dieser Arbeit schematisch dargestellt (Abbildung 2).



---

Abbildung 2 - Flussdiagramm zum Ablauf des Versuchs

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Versuchstiere

163 Tiere wurden in den Infektionsställen der Klinik für kleine Klautiere der Tiermedizinischen Hochschule Hannover mit dem Bakterium *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae* unter standardisierten Bedingungen infiziert. Die Deutsche-Landrasse- Tiere wurden von einem Nukleusbetrieb des BHZP zur Verfügung gestellt.

Die Tiere wurden bereits im Betrieb gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* und Porzines Circovirus Typ 2 (PCV-2) geimpft und 3 Wochen vor der Infektion angeliefert. Sie wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien zum Schutz von Wirbeltieren innerhalb experimenteller oder anderer wissenschaftlicher Nutzung gehalten. Die Ethikkommission des Bundesministeriums für Landwirtschaft und Ernährung hat die Versuchsbedingungen genehmigt (Aktenzeichen: 33.9-42502-04-15/1962). Auf 8 m<sup>2</sup> wurden 8 bis 10 Tiere gehalten und nach einer kommerziellen standardisierten Diät gefüttert.

#### 3.1.2 Laborgeräte

Zentrifugen	Heraeus Biofuge fresco und Heraeus Labofuge 400, Thermo Fisher Scientific, Dreieich Heraeus Labofuge 400, PerfectSpin P, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortexer	Heidolph Elektro KG, Hanau
Thermocycler	T-Gradient, Whatman Biometra, Göttingen
Photometer	Nanodrop 1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Fluorometer	Qubit 2.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Gelelektrophorese	Agilent 2100 BioAnalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Sequenzierautomat	Illumina HiSeq 2500/Illumina cBot, Illumina Inc., San Diego, Kalifornien, USA
Ultraschallfragmentierer	Covaris S220 Focused-ultrasonicator, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Magnetrührer, beheizbar	Monotherm grau, H+P Labortechnik
Real-Time-PCR-System	ABI 7300, Thermo Fisher Scientific, Dreieich ABI 7500 Fast, Applied Biosystems, Dreieich
Wärme- und Schüttelschrank	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Falcons, 15ml/50ml	VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäße 0,2ml/0,5ml/1,5ml/2ml	Nerbe Plus GmbH, Winsen (Luhe) Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Platten	Flat Deck Thermo Fast 96 Detection Plate, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Pipetten 1-10µl/10-100µl/100-1000µl	Biohit, Rosbach RAININ Pipet-Lite XLS, Mettler, Toledo, USA
Pipettenspitzen 0,1-10µl/10-100µl/100-1000µl	VWR, Darmstadt Nerbe Plus GmbH, Winsen(Luhe) RAININ LTS Filterspitzen, Mettler, Toledo, USA
96-Well-Platten	Twin.tec PCR plate, unskirted, Eppendorf

	(Library Prep) MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher Scientific, Dreieich (Realtime-PCR Freising)
Folie 96-Well-Platten	MicroAmp Optical Adhesive Film, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Magnetständer ( <i>Magnetic stand</i> )	Magnetfuß-96, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Deckel für PCR-Reaktionsgefäß 8er-Streifen	Nerbe Plus GmbH, Winsen(Luhe)

### 3.1.4 Chemikalien

Primer	Biomers.net GmbH, Ulm
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
NP40	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Exonuclease 1	ThermoFisher Scientific, Dreieich
Alkalische Phosphatase	ThermoFisher Scientific, Dreieich

Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Polysorbat 20	TWEEN®20, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg

### 3.1.5 Lösungen, Puffer und Medien

1x PK-Puffer	0,2 M Tris 40 mM EDTA 1 M NaCl
1x TE-Puffer	10 mM Tris-HCL 1 mM EDTA
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA Ad 1000 ml Wasser
Agarosegel (1,5 %) (Zusammensetzung für 100ml)	Agarose 1,5 g 1x TAE-Puffer 100 ml 5µl Midori Green Advance

### 3.1.6 Kommerzielle Reagenziensysteme

DNA-Vorbereitungs- kit (Sequenzierung)	TruSeq DNA PCR-free preparation kit, Illumina, San Diego Kalifornien, USA
DNA-Isolationskit	INSTANT Virus RNA Kit, Analytik Jena, Jena

Library-Quantifizierungskit	KAPA Library Quantification Kit, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Qiagen Multiplex PCR-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
KASP-Genotypisierungs-Mastermix	LGC-Genomics, UK
KASP-Genotypisierungs-Primer-Mix	Assay Mix, LGC Genomics, UK

### 3.1.7 Computer, EDV-Programme und Datenbanken

#### 3.1.7.1 Computer

Notebook mit i5-Prozessor, 8 GB Arbeitsspeicher mit Betriebssystem Linux Ubuntu 14.04. & Windows 10 Dual-Boot

#### 3.1.7.2 Computerprogramme:

Sequence Analysis Viewer	Illumina®, San Diego Kalifornien, USA, <a href="https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav/downloads.html">https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_software/sequencing_analysis_viewer_sav/downloads.html</a>
Bcl2fastq	Illumina®, San Diego Kalifornien, USA, <a href="https://support.illumina.com/downloads/bcl2fastq_conversion_software_184html">https://support.illumina.com/downloads/bcl2fastq_conversion_software_184html</a>
Burrows-Wheeler Aligner	MIT Lizenz, <a href="http://bio-bwa.sourceforge.net/">http://bio-bwa.sourceforge.net/</a>
Samtools	BSD, MIT Lizenz, <a href="http://www.htslib.org/">http://www.htslib.org/</a>
Picardtools	Broadinstitute, <a href="http://broadinstitute.github.io/picard/">http://broadinstitute.github.io/picard/</a>

Beagle 4.1	B L Browning and S R Browning, <a href="https://faculty.washington.edu/browning/beagle/b4_1.html">https://faculty.washington.edu/browning/beagle/b4_1.html</a>
Genome Analysis Toolkit (GATK)	Broadinstitute, <a href="https://software.broadinstitute.org/gatk/">https://software.broadinstitute.org/gatk/</a>
Plink 1.9	Shaun Purcell, Christopher Chang <a href="http://www.cog-genomics.org/plink/1.9/">www.cog-genomics.org/plink/1.9/</a>
Python (Anaconda Package)	Anaconda Inc., <a href="https://www.anaconda.com">https://www.anaconda.com</a>
Oligo Primer-Design	Eurofins MWG operon, Ebersberg
Variation Effect Predictor (Ensembl)	<a href="https://www.ensembl.org/vep">https://www.ensembl.org/vep</a>
Primer Design Tool (NCBI)	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
Microsoft Office	Microsoft Corporation
Citavi	Swiss Academic Software GmbH
APE-A Plasmid Editor	M. Wayne Davis, <a href="https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/">https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/</a>
SPSS	IBM SPSS
GNU PSPP	Free Software Foundation, Inc., <a href="http://fsf.org/">http://fsf.org/</a>

3.1.7.3 Datenbanken

National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Ensembl genome browser 94	<a href="https://www.ensembl.org">https://www.ensembl.org</a>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Eingangsuntersuchung und experimentelle Infektion

Nach der 3-wöchigen Eingewöhnungszeit, in der sich die Tiere an das neue Futter, die neue Umgebung sowie die regelmäßige (zwei Mal täglich) klinische Untersuchung gewöhnt hatten, wurden alle Tiere klinisch, radiologisch und sonographisch untersucht (Hoeltig et al. 2009; Reiner et al. 2014a; Reiner et al. 2014b). Die radiologische Untersuchung erfolgte in der latero-lateralen Ebene sowie in der dorso-ventralen Ebene. Über eine endoskopische Untersuchung wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) mit 100 ml 0,9 % NaCl durchgeführt. Zudem wurden Serum- und EDTA-Blutproben genommen. Aus der BALF wurde zum Ausschluss einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* eine PCR (Frey 2003) sowie eine kulturelle Untersuchung durchgeführt. Aus den Serumproben wurden ELISA-Tests auf das ApxIV-Toxin von *A. pleuropneumoniae* (IDEXX APP—ApxIV Ab Test®, Co. IDEXX Laboratories, Maine, USA) durchgeführt. Aus den EDTA-Blutproben wurde DNA isoliert. Die radiologische und sonographische Untersuchung sowie die BAL wurden in Narkose mit 20mg/kg Ketamin und 2mg/kg Azaperon über eine intramuskuläre Injektion durchgeführt.

Lediglich klinisch gesunde Tiere wurden für den Infektionsversuch verwendet.

Die Tiere wurden in Gruppen von maximal 6 Tieren in einer spezialangefertigten Infektionskammer einem erregerehaltigen Aerosol über 30 min ausgesetzt (Jacobsen et al. 1996). Dabei wurden annäherungsweise  $1 \times 10^5$  Bakterien verwendet, um im Aerosol eine Konzentration von  $1 \times 10^2$  kolonieformenden Einheiten (CFU) pro Liter Aerosol zu erhalten.

Innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Infizierung wurden die Tiere alle 2 Stunden klinisch untersucht; nach dieser Zeitspanne zweimal pro Tag. Die Untersuchung bestand aus einer Beurteilung des Allgemeinbefindens der Tiere in Verbindung mit der Futteraufnahme, dem Bewegungsausmaß, dem Bewusstsein, der Temperatur, ob die Tiere Erbrechen gezeigt haben und einer detaillierten Erfassung des Atmungsapparates (Hoeltig et al. 2009). Kriterien, die zum Ausschluss vom Versuch bzw. zur Euthanasie führten, wurden von Hoeltig et al. (Hoeltig et al. 2009) übernommen. Im Falle eines Versterbens der Tiere vor der pathologischen Untersuchung wurde dies schriftlich festgehalten.

### 3.2.2 Pathologische Untersuchung

Am 7. Tag nach der Infektion (p.i.) wurden analog zu der Eingangsuntersuchung eine Sonografie, eine Röntgenologie und eine Endoskopie mit BAL durchgeführt. Im Anschluss wurden die Tiere mittels Pentobarbital euthanasiert und pathologisch untersucht. Dabei wurde die Lunge nach dem Schema von Hannan et al. (1982) in 32 Segmente aufgeteilt. Jedes einzelne Segment wurde palpatorisch und optisch beurteilt; nicht physiologische Segmente wurden schematisch kartiert.

### 3.2.3 Bakteriologische Untersuchung

Um die Besiedlung der Lunge mit *A. pleuropneumoniae* nach der Infektion darzustellen, wurden Gewebeproben von jedem der sieben Lungenlappen sowie der Tonsille und einem Lungenlymphknoten genommen und auf einem Columbia-Agar kultiviert. Dabei wurde über die semi-quantifizierende Methode ein Reisolationscore gebildet. Punkte wurden von 0 (kein Wachstum von *A. pleuropneumoniae*) bis 3 (Wachstum in beiden Fraktionen des Ausstrichs) (Jacobsen et al. 1996; Maas et al. 2006b) vergeben.

### 3.2.4 DNA-Extraktion aus EDTA-gerinnungsgehemmtem Blut

Die DNA-Extraktion wurde mit einem Aussalzverfahren sowie anschließender Isopropanolfällung durchgeführt. Als Ausgangsmaterial stand mittels Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gerinnungsgehemmtes Blut zur Verfügung.

Aus dem Probenmaterial wurden 5 – 10 ml in 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt.

Das EDTA-Blut wurde auf 40 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt, 5ml 1,8% *NaCl* hinzugegeben und gemischt. Das hämolysierte Blut wurde anschließend bei 2500xg 30 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und das Pellet gemischt. Die Kernlyse erfolgte durch Auffüllen auf 45 ml Gesamtvolumen mit 0,1% *NP40* und Mischen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 30 Minuten bei 2500xg wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das Pellet gemischt. Zur Entfernung von Proteinen wurde auf das verbleibende Pellet 2,5 ml PK-Puffer, 200 µl 10% *SDS* und 25µl Proteinase K gegeben, vorsichtig gemischt und über Nacht bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Das Aussalzen der

Proteine erfolgte durch Zugabe von 2ml 5M  $NaCl$ -Lösung, anschließendem Mischen und Zentrifugation für 30 Minuten bei 3600xg. Der Überstand wurde in ein 15 ml-Greiner-Röhrchen überführt und mit gleichem Volumen Isopropanol (Verhältnis 1:1) überschichtet. Das Röhrchen wurde vorsichtig so lange invertiert, bis die DNA vollständig in Form von weißen Schlieren präzipitiert war. Die ausgefallene DNA wurde mit abgeschnittenen Spitzen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Entfernen des überschüssigen Salzes aus der präzipitierten DNA erfolgte durch Zugabe von 700  $\mu$ l 70% Ethanol und einer Zentrifugation für 10 min bei 10.000xg. Der Überstand wurde komplett verworfen und das Pellet mit 500  $\mu$ l 70% Ethanol versetzt und so lange gemischt, bis das Pellet frei beweglich war. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 15.000xg für 2 min. Der letzte Waschschrift wurde noch ein weiteres Mal wiederholt, der Überstand abgegossen und das Pellet bei Raumtemperatur (im Schüttler) getrocknet. Abschließend erfolgte das Auflösen des DNA-Pellets in 100  $\mu$ l TE (pH 8,0) für 2 Stunden bei 56°C im Trockenschrank.

### 3.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde zunächst photometrisch (Nanodrop™ 1000) gemessen und auf 100 ng/ $\mu$ l eingestellt. Da für die Erstellung von Bibliotheken („*library preparation*“) für das *Next-Generation-Sequencing* die DNA-Konzentration entscheidend ist, wurde die DNA-Konzentration zusätzlich fluorometrisch (Qubit™) gemessen. Im Anschluss wurde die mittels Fluorometer (Qubit™) gemessene DNA auf 30 ng/ $\mu$ l mit TE-Puffer verdünnt.

### 3.2.6 Next-Generation-Sequencing (Second-Generation-Sequencing)

Die Methode des *Next-Generation-Sequencing* (NGS) bezieht sich auf eine Vielzahl von neu entwickelten Sequenzieretechniken, die im Zuge des „Human Genome Project“ aufgekomen sind. Für die erste komplette Sequenzierung des Humangenoms wurde noch die von Friedrich Sanger 1977 entwickelte sogenannte Kettenabbruchmethode verwendet (*First-Generation-Sequencing*). Die Kompletzsequenzierung war jedoch mit hohen Kosten und einem hohen Zeitaufwand (ca. 10 Jahre) verbunden, sodass die Entwicklung neuer Technologien vorangetrieben wurde. Die NGS-Technologien, die seit 12 Jahren zur Verfügung stehen (Schuster 2008), verringerten den Zeitaufwand

von 10 Jahren auf 4 Tage und die Kosten von 1 Mio. Euro auf derzeit 1000 Euro, und es können bis zu 166 Proben parallel sequenziert werden (immer bezogen auf das Humangenom). Inzwischen gibt es einige Firmen, die Geräte für das *Next-Generation-Sequencing* vertreiben (z.B. das 454-System von Roche, der Genome Analyzer von Solexa [Illumina] und der SOLiD von Agencourt). Mittlerweile sind bereits Systeme der dritten Generation (*Third-Generation-Sequencing*) in Entwicklung (Pacbio und Nanopore), die es dem Untersucher erlauben, in kürzerer Zeit mehr Daten zu generieren. Weiterhin können längere DNA-Sequenzen an einem Stück abgelesen werden, und die Bearbeitungszeit der Probe von der Isolation der DNA bis hin zum Eingeben in das eigentliche System kann dramatisch verkürzt und automatisiert werden (Nanopore).

Die Sequenzierung der Proben für diese Arbeit wurde unter Anleitung eigenständig an der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Tierzucht mit einem Illumina HiSeq 2500™-System durchgeführt. Dieses Gerät arbeitet über die Methode des Sequencing-by-Synthesis.

Die verdünnten Proben werden in Form von Bibliotheken (*Libraries*) auf eine sogenannte Fließzelle (*Flow-Cell*) aufgetragen, die eine Beschichtung mit zu den Bibliotheken korrespondierenden Oligonukleotiden aufweist. Nachdem sich die einzelnen Bibliotheken an die Oligonukleotide angeheftet haben, werden die einzelnen Fragmente über eine PCR-basierte sogenannte Brückenamplifikation vermehrt. Es bilden sich Bereiche mit tausenden Amplifikaten (Cluster) aus, die innerhalb dieser Cluster die gleiche Sequenz aufweisen. Dies geschieht, um das Signal zu verstärken, das im Rahmen des späteren *Sequencing-by-Synthesis* beim Einbau jeder einzelnen Base durch Fluoreszenz entsteht. Wie bereits erläutert, verläuft anschließend das Ablesen der Einzelfragmente innerhalb der ausgebildeten Cluster über ein *Sequencing-by-Synthesis*-Verfahren mittels weiterer PCR-Reaktionen unter Verwendung von 4 verschiedenen fluoreszierenden, mit einem reversiblen Terminator versehenen dNTPs, die die Sequenz eines Clusters über eine Kamera in Echtzeit bestimmen. Dabei amplifiziert, ähnlich wie bei einer PCR, eine spezielle Polymerase die einzelnen DNA-Stränge. Durch die innerhalb der zur Verfügung stehenden Nukleotide befindlichen reversiblen Terminatoren kann immer jeweils nur eine Base eingebaut werden, die ein Fluoreszenzsignal abgibt, das durch ein Kamerasystem aufgezeichnet wird. Somit werden die Sequenzen der einzelnen Fragmente in Echtzeit während der Synthesisierung der DNA bestimmt. Der komplette Vorgang des NGS ist schematisch in Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellt.

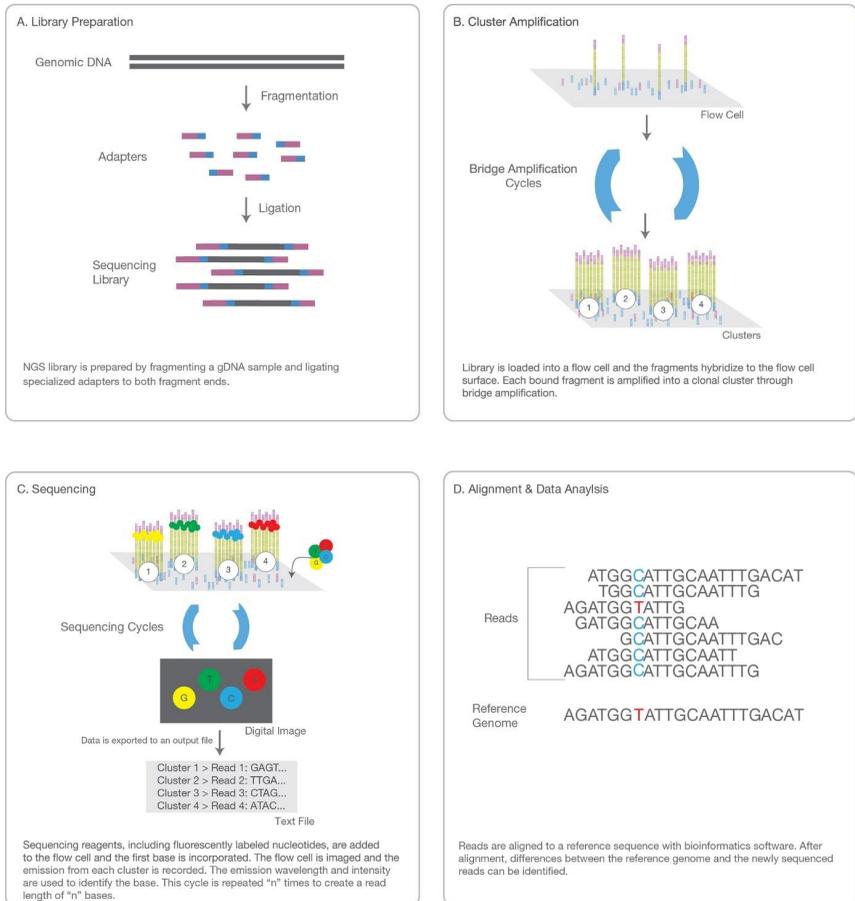


Abbildung 3 - Schematische Darstellung des Next-Generation-Sequencing (Courtesy of Illumina, Inc.)

A Aufbereitung der Proben über eine Fragmentation der DNA und die Erstellung der Libraries (Bibliotheken)

B Bindung der Libraries auf der Fliesszelle (Flow-Cell) und Bildung von Clustern der gleichen Library

C Generierung des Lichtsignals und das Ablesen der einzelnen Basen und

D Anlegen der generierten Reads an ein Referenzgenom zur Darstellung von

Einzelnukleotidpolymorphismen (Single-Nucleotide-Polymorphisms – SNPs) – hier türkis/rot markiert

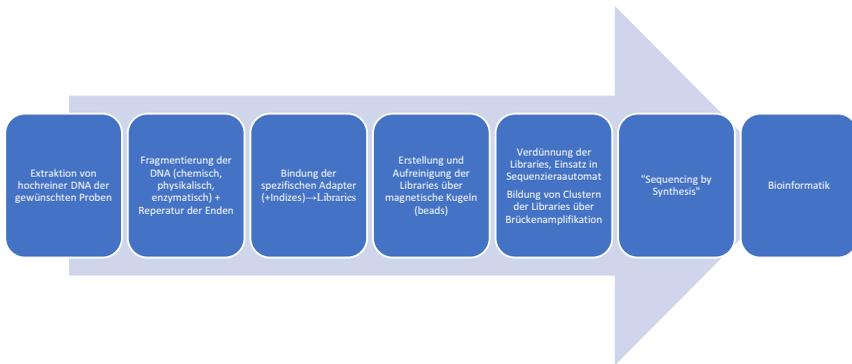


Abbildung 4 - Schematischer Ablauf der Probenvor- und -nachbereitung für das NGS

Die auf 20 – 30 ng/μl eingestellte DNA (55μl) wurde im ersten Schritt über den Covaris S220-Ultraschallfragmentierer nach den im TruSeq DNA PCR Free Sample Preparation Kit vorgeschriebenen Einstellungen fragmentiert (Tastverhältnis: 5%, PIP: 175W, Zyklen pro Stoß:200, Dauer:50s, Modus: *Frequency sweeping*, Temperatur:5,5-6°C). Im Anschluss erfolgte die Erstellung der zur Sequenzierung nötigen Bibliotheken (*Libraries*) über das „TruSeq®DNA PCR-Free Sample Preparation Kit LT“, welches die SPRI-Technologie (Solid-Phase-reversible-Immobilization) zur Aufreinigung der Nucleinsäuren nutzt. Dabei sind die genutzten *SPRI-Beads* paramagnetisch und binden DNA reversibel innerhalb eines bestimmten Milieus bestehend aus Polyetylen glycol und Salz.

Zur Aufreinigung wurden jeweils 50 μl der fragmentierten DNA in ein Well einer 96-Well-Platte übertragen. Nach gründlicher Homogenisierung der *SPRI-Beads* (hier: *Purification-Beads*) wurden 80 μl der *Purification-Beads* in jedes Well der 96-Well-Platte pipettiert und durch auf- und Abpipettieren gründlich gemischt. Die Platte wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte auf einen Magnetständer gestellt; die *Beads* wurden magnetisiert und an den Rand des jeweiligen Wells gebunden. 125 μl vom Überstand wurde aus jedem Well verworfen (ohne die *Beads* zu berühren), und die am Rand des Well gebundenen *Beads* wurden jeweils zweimal (auf dem Magnetständer) mit 200 μl 80-prozentigem Ethanol pro Well gewaschen, anschließend jeweils 30 Sekunden inkubiert und der Überstand verworfen. Die 96-Well-Platte wurde für 5 Minuten getrocknet, vom Magnetständer genommen und in jedes Well 52,5 μl *Resuspension-Buffer* hineinpipettiert, um die *Beads* wieder vollständig zu suspendieren. Nach 2 Minuten Inkubationszeit wurde die 96-Well-Platte wieder auf den Magnetständer verbracht, bis die Lösung klar erschien. Jeweils 50 μl vom Überstand pro Well wurden in eine neue 96-Well-Platte pipettiert, und anschließend erfolgte die Reparatur der Enden der Fragmente. Dabei wurde der *End Repair Mix* verwendet – ein Enzym-Mix aus unter anderem

T4-Polynukleotidkinase und T4-DNA-Polymerase –, um die Enden der fragmentierten DNA anzugleichen und am 5'-Ende zu phosphorylieren. Dazu wurden 10 µl *Resuspension-Buffer* und 40 µl des gründlich gemischten *End Repair Mix* auf Eis in jedes Well hinzugefügt, gründlich gemischt und im Thermocycler bei 30°C für 30 Minuten inkubiert.

Die so vorbereitete fragmentierte und phosphorylierte DNA wurde wiederum durch die Zugabe einer verdünnten *Bead-Lösung* auf eine bestimmte Größe (ca. 300 bp) aufgereinigt. Pro Probe wurden 109,25 µl der im Kit enthaltenen *Sample-Purification- Beads* mit 74,75 µl Wasser verdünnt. Es wurden jeweils 160 µl in jedes Well der 96-Well-Platte pipettiert und gründlich durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte für 5 Minuten auf den Magnetständer gestellt. Anschließend wurden 250 µl vom Überstand in zwei Schritten in eine neue 96-Well-Platte überführt sowie die verbleibenden *Beads* mitsamt der alten 96-Well-Platte verworfen. Um weiterhin kleinere verbliebene DNA-Fragmente herauszufiltern, wurden wiederum 30 µl unverdünnter *Sample-Purification-Beads* in jedes Well der Platte gegeben und gründlich gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die 96-Well-Platte wurde anschließend auf den Magnetständer gestellt und wiederum 5 Minuten inkubiert. Jeweils 138 µl vom Überstand wurden in zwei Schritten verworfen (insgesamt 276 µl), und die verbliebenen *Beads* innerhalb der einzelnen Wells wurden in jeweils zwei Schritten mit 200 µl 80-prozentigem Ethanol 30 Sekunden lang inkubiert (gewaschen) und der Überstand anschließend wieder verworfen. Nachdem der Überstand restlos abpipettiert wurde, erfolgte eine Trocknungsphase vom 5 Minuten. Nach der Trocknung wurde die Platte wieder vom Magnetständer genommen und 17,5 µl *Resuspension-Buffer* hinzugefügt, wiederum auf den Magnetständer verbracht und nach 5 Minuten (als die Lösung klar wurde) 15 µl vom Überstand in eine neue 96-Well-Platte überführt, mit der anschließend weitergearbeitet wurde. Um die 3'-Enden zu adenylieren, wurde nach der Zugabe von 2,5 µl *Resuspension-Buffer* in jedes Well der im Kit enthaltene *A Tailing Mix* aufgetaut und auf Eis 12,5 µl in jedes Well gegeben. Die Platte wurde im Thermocycler bei folgenden Einstellungen inkubiert: 37°C für 30 Minuten, 70°C für 5 Minuten, 4 °C für 5 Minuten.

Im nächsten Schritt erfolgte die Bindung der Adapter an die aufgereinigte, 3'-adenylierte und 5'-phosphorylierte, fragmentierte DNA. Dafür wurde wieder jeweils 2,5 µl *Resuspension-Buffer* in jedes Well hinzugefügt und die Platte anschließend auf Eis gestellt. Pro Well wurden 2,5 µl vom im Kit enthaltenen *Ligation Mix* in jedes Well pipettiert sowie anschließend 2,5 µl vom jeweiligen Adapter hinzugefügt. Da das oben erwähnte Kit als *Low-Throughput (LT)*-Variante genutzt wurde, waren 24 Adapter enthalten. Die 96-Well-Platte wurde anschließen für 10 Minuten bei 30°C im Thermocycler inkubiert. Durch die Zugabe von 5 µl *Stop-Ligation-Buffer* und anschließendes gründliches Mischen wurden die im *Ligation Mix* enthaltenen Enzyme (u.a. Polymerase) inhibiert. Um die erhaltenen fertigen *Libraries* aufzureinigen und alle noch verbliebenen Enzyme zu entfernen, wurden die *Libraries*

(DNA) in zwei weiteren Aufreinigungsschritten mittels *Purification-Beads* gebunden und mit 80 %igem Ethanol gewaschen sowie in *Resuspension-Buffer* resuspendiert. Im ersten Aufreinigungsschritt wurden pro Well jeweils 42,5 µl *Sample-Purification-Beads* hinzugefügt, gründlich gemischt und 5 Minuten inkubiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf dem Magnetständer wurden 80 µl vom Überstand pro Well verworfen (ohne die *Beads* zu berühren) und in jedes Well 200 µl 80-prozentiges Ethanol hinzugefügt, 30 Sekunden inkubiert und der Überstand wiederum verworfen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, der Überstand restlos abpipettiert und die Platte bei RT 5 Minuten getrocknet. Weiterhin wurden die 96-Well-Platte vom Magnetständer genommen und 52,5 µl *Resuspension-Buffer* in jedes Well hinzugegeben und gemischt, bis die *Beads* wieder vollständig im *Resuspension-Buffer* suspendiert waren. Die 96-Well-Platte wurde anschließend wieder auf den Magnetständer gestellt, und nach 5 Minuten 50 µl vom Überstand aus jedem Well in eine neue 96-Well-Platte pipettiert. Diese Aufreinigung wurde mit jeweils 50 µl *Purification-Beads* noch einmal wiederholt; anschließend wurden 20 µl der aufgereinigten fertigen *Libraries* (Bibliotheken) in eine neue 96-Well-Platte pipettiert, und diese wurde mittels *Stripes* verschlossen. Die DNA-Konzentration der erstellten *Libraries* (Bibliotheken) sowie die Fragmentgröße wurden über die Messung mit dem Qubit™-Fluorometer und dem BioAnalyzer von Agilent (DNA 1000 Chip) überprüft. Der BioAnalyzer 2100 wurde mit dem Agilent-high-Sensitivity-DNA-Assay-Protokoll betrieben, wobei die Größe der erstellten Bibliotheken über eine automatisierte Gelelektrophorese, die innerhalb eines *Chips* stattfindet, dargestellt wurde. Eine exakte Amplifikation der Bibliotheken über eine qPCR mittels spezieller Primer, die lediglich an bestimmte Sequenzen der Adapter binden, erfolgte zusätzlich, wobei das Kapa Library Quantification Kit von Kapa Systems verwendet wurde. Die erstellten *Libraries* wurden zusammen mit bereits sequenzierten Proben bekannter DNA-Konzentration als Positivkontrolle im ersten Schritt 1 zu 1000 verdünnt (1µl Probe und 999 µl Tween [0,1 %]) und eine Verdünnungsreihe mit DNA-Konzentrationen von 20 pM, 2 pM, 0,2 pM, 0,02 pM und 0,002 pM aus den Positivkontrollen erstellt. Anschließend wurde 6µl Master-Mix, bestehend aus 5µl *Kapa SYBR Mastermix*, jeweils 0,2 µl (10µM) Forward- und Reverse-Primer, 0,4µl Wasser und 0,2µl Rox-low, in eine 96-Well-Platte pro Well vorgelegt und jeweils 4µl verdünnte Probe oder Standard hinzu pipettiert. Das Programm der qPCR war wie folgt: Initiale Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten und anschließend 35 Zyklen mit 95°C für 30 Sekunden und 60°C für 45 Sekunden.

Die gemessenen Bibliotheken wurden in Folge auf 2nM verdünnt, mit NaOH denaturiert und auf ein Trägermedium (Fließzelle (Flow-Cell)) aufgetragen. Es wurden Paired-End-Reads mit jeweils 126 Zyklen sequenziert.

### 3.2.7 Bioinformatik

Nachdem die Sequenzierung auf dem Sequenzierautomat abgeschlossen war, wurden die ungeordneten Daten in *bcl*-Format den einzelnen Tieren anhand der Adaptersequenz zugeordnet (*demultiplexen*) und über das Programm *bcl2fastq* von Illumina ([http://emea.support.illumina.com/downloads/bcl2fastq\\_conversion\\_software\\_184.html?langsel=/de/](http://emea.support.illumina.com/downloads/bcl2fastq_conversion_software_184.html?langsel=/de/)) in das *fastq*-Format überführt.

Anschließend wurden die Rohdaten im *fastq*-Format über das Programm *Burrows-Wheeler Alignment Software* (Li et al. 2009a) mit dem *mem*-Algorithmus an das aktuelle Schweinereferenzgenom *Sus scrofa* 11.1 (*S. scrofa* 11.1, Genbank assembly accession: GCA\_000003025.6) angelegt („*aligned*“).

### 3.2.8 Bioinformatik - Variant-Calling

Alle Programme zur Rohdatenverarbeitung wurden am Lehrstuhl für Tierzucht der Technischen Universität München in Freising unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Rudolf Fries durch interne Skripte in der Programmiersprache Python miteinander verknüpft (analog zur Einbindung des Programms *Plink* in ein Python-Skript und der Erstellung von Manhattan-Plots und Q-Q-Plots – siehe Anhang 9.6) und über ein Serversystem ausgeführt. Der Verlauf der bioinformatischen Aufarbeitung wird in Abbildung 5 dargestellt.

Die Qualität der Rohdaten wurde mit *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) bewertet.

Die Rohdaten im *bcl*-Format („base call file“) wurden über das Programm *bcl2fastq* von Illumina in das *fastq*-Format überführt ([http://emea.support.illumina.com/downloads/bcl2fastq\\_conversion\\_software\\_184.html?langsel=/de/](http://emea.support.illumina.com/downloads/bcl2fastq_conversion_software_184.html?langsel=/de/)). Die Daten im *fastq*-Format wurden an das aktuelle Schweinereferenzgenom *Sus Scrofa* 11.1 (Genbank assembly accession: GCA\_000003025.6) über den *mem*-Algorithmus der *Burrows-Wheeler Alignment Software* (Li et al. 2009a) *aligned*.

Bei einer ersten Qualitätskontrolle der Daten wurden mit der Software *Picard* (<https://broadinstitute.github.io/picard>) die *Read-Groups* identifiziert und doppelt vorkommende *Reads* markiert und entfernt. Weitere allgemeine Statistiken beinhalteten die Gesamtanzahl der *Reads*, die Anzahl der *Reads*, die an das Referenzgenom angelegt werden konnten, die Anzahl der *Reads*, die paarig vorlagen, einzelne *Reads* sowie *Reads* mit einem Gegenstück, das auf einem

anderen Chromosom des Referenzgenoms angelegt werden konnte. Diese Statistiken wurden mit dem Programm *Samtools* (Li et al. 2009b) erstellt.

Das Erstellen der Varianten (*Variant-Calling*) folgte den Vorgaben des *Genome Analysis Toolkit – Best Practices Workflow* (McKenna et al. 2010). Der von dem Sequenzierautomat erstellte *Phred-Score*, der die Fehlerrate der Sequenzierung abschätzt, ist oft selbst fehlerhaft und muss korrigiert werden. Daher wurde der *Phred-Score* mittels der *Base Quality Score Recalibration* (BQSR) über das *Genome Analysis Toolkit* (GATK) neu kalibriert (DePristo et al. 2011; van der Auwera et al. 2013), wobei Referenzvarianten des Schweinegenoms von der Ensembl-Datenbank 91 genutzt wurden. Im nächsten Schritt wurde der *HaplotypeCaller* (DePristo et al. 2011; McKenna et al. 2010; van der Auwera et al. 2013) auf die rekalierten Varianten angewandt. Das Programm definiert mögliche Variantenpositionen und stellt anhand von De-Bruijn-Graphen alle möglichen Unterschiede zwischen den Proben- und Referenz-Haplotypen dar. Durch den im Programm implementierten Smith-Waterman-Algorithmus (Smith et al. 1981) werden dann die neu entdeckten Haplotypen mit den Referenz-Haplotypen aligned, um alle möglichen Varianten zu erhalten. Über den PairHMM-Algorithmus (Poplin et al. 2017) werden dann die einzelnen *Reads* gegen jeden gefundenen Haplotype angelegt (*aligned*), um eine Maximal-Wahrscheinlichkeits-Matrix (*Maximum-Likelihood-Matrix*) der *Reads* gegen die Haplotypen zu erhalten. Auf diese Wahrscheinlichkeitsmatrix der Haplotypen innerhalb der *Reads* wendet das Programm das Bayes-Theorem an, um den wahrscheinlichsten Genotyp zu erstellen, der dann der jeweiligen Probe zugeordnet wird.

### 3.2.9 Qualitätskontrolle der Varianten

Zur Kontrolle der Richtigkeit und Qualität der entdeckten Varianten wurden mehrere GATK-Filter angewandt (DePristo et al. 2011; McKenna et al. 2010; van der Auwera et al. 2013): Dabei beschreibt der Quality-by-Depth“(QD)-Parameter die Qualität der einzelnen SNPs über das Verhältnis des vom Sequenzierautomaten erstellten „Qual“-Wertes zur Sequenziertiefe. QD Werte < 2 werden als falsch-positive Varianten herausgefiltert.

Der „*FisherStrand*“-Wert (FS) beschreibt das vermehrte Vorkommen der alternierenden oder Referenz-Allele auf einem bestimmten DNA-Strang (positiv oder negativ). Der FS-Wert sollte somit gegen 0 tendieren. Als Grenzwert werden bei SNPs Werte < 60 und bei InDels Werte < 200 angenommen.

Der „*RMSMappingQuality*“-Wert ist die Quadratwurzel aus dem Mittelwert der „*Mapping-Quality*“, wobei die Standardabweichung der Qualität mit einbezogen wird. Als guter Wert sind MQ-Werte von 60 zu bezeichnen, wobei alle Varianten mit einem MQ-Wert  $< 40$  herausgefiltert werden.

Der „*MappingQualityRankSumTest*“ vergleicht die Werte der „*Mapping-Quality*“ zwischen dem Referenz-Allel und dem alternierenden Allel. Positive Werte zeigen, dass die Mapping-Qualities, für das alternierende Allel höher sind als für das Referenz-Allel. Als Grenzwerte werden GATK-Werte von  $-12,5$  (SNP) vorgeschlagen.

Der „*ReadPosRankSumTest*“ testet die Position der Varianten innerhalb der einzelnen *Reads*. Es werden Unterschiede der Position der alternierenden und Referenz-Allele aufgezeigt. Wenn ein Allel immer oder häufig am Ende eines „*Reads*“ vorkommt, deutet das auf einen möglichen Sequenzierfehler hin. Negative Werte zeigen auf, dass alternierende Allele häufiger als Referenz-Allele am Ende der *Reads* zu finden waren. Positive Werte zeigen auf, dass Referenz-Allele häufiger als alternierende Allele am Ende der *Reads* zu finden waren. Werte von  $-8$  (SNP) und  $-20$  (InDel) werden als Grenzwerte genutzt.

Zusammenfassend wurden verwendet:

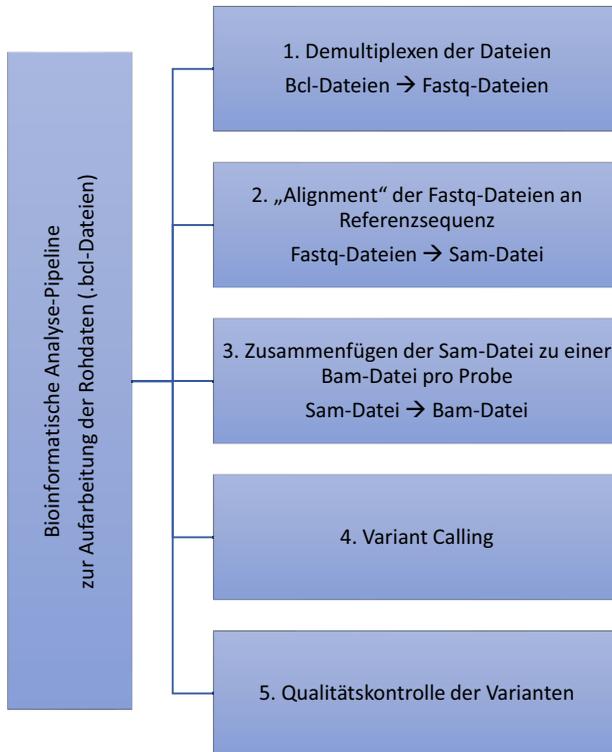
- die *Quality-by-Depth* (QualByDepth, QD), bei dem der *Quality-Score* (Qual) geteilt durch die Sequenziertiefe (*Depth*) dargestellt wird,
- der *FisherStrand*-Wert (FS), der ein *Phred*-skalierter p-Wert ist und über einen exakten Fisher-Test bestimmt wird, um einen DNA-Strang-Bias zu entdecken,
- die *RMSMappingQuality* (MQ), die Quadratwurzel aus der Qualität der Zuordnung der einzelnen *Reads* (*Mapping-Quality*),
- der *MappingQualityRankSumTest*-Wert (MQRankSum), ein Mann-Whitney-Wilcoxon-Rangsummentest der *Mapping Quality*, sowie
- der *ReadPosRankSumTest*-Wert, der ebenfalls einen Mann-Whitney-Wilcoxon-Rangsummentest für die Distanz der Varianten vom Ende der *Reads* darstellt.

Die genannten Filteroptionen wurden mit jeweils unterschiedlichen Parametern auf SNPs und Indels angewandt (Tabelle 4). Die gesamte bioinformatische Aufarbeitung der Rohdaten ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

*Tabelle 4 - Parameter der GATK-Filter zur Überprüfung der Richtigkeit und Qualität der Varianten*

	SNP	Indel
QualByDepth (QD)	<2	<2
FisherStrand (FS)	>60	>200
RMSMappingQuality(MQ)	<40	-
MappingQualityRankSumTest	<-12,5	-
ReadPosRankSumTest	<-8	-20
Quality	>999	>999
Depth	>4	>4

---



---

Abbildung 5 - Bioinformatische Aufarbeitung der Rohdaten

### 3.2.10 Effekte der Varianten

Die Annotation der Varianten mit den zugehörigen Genen erfolgte mit dem *Variant Effect Predictor* (VEP) von Ensembl (McLaren et al. 2016; Yates et al. 2020). Das Perl-Skript identifiziert Gene, Transkripte, Proteine und regulatorische Regionen, die potentiell von den Basenaustauschen betroffen sind, und gibt die Lokalisation der Varianten in Bp sowie die potentiellen Konsequenzen für das Protein aus. Von bereits bekannten Varianten wird die rs-Nummer (rs, „reference sequence“) ausgegeben.

### 3.2.11 Imputation

Aufgrund der Herangehensweise dieser Arbeit, Tiere mit relativ niedriger Abdeckung zu sequenzieren, wurden die Daten über eine Referenzpopulation imputiert, um die Qualität der Varianten zu verbessern. Dafür wurden Sequenzen von einer Population von 45 Deutsche-Landrasse-Tieren, 46 Piétrain-Tieren, 4 Hampshire-Tieren und den von uns sequenzierten 74 ausgewählten Tieren verwendet, um die fehlenden oder falschen Genotypen mit Hilfe der Referenzpopulation zu schätzen. Dafür haben wir über die Variantenaufbereitung (siehe 3.2.9 Qualitätskontrolle der Varianten) alle Varianten mit einer Abdeckung  $< 4$  als fehlend betrachtet und diese über die Imputation neu geschätzt. Die Imputation wurde mit dem Programm Beagle 4.1 mit 15 Iterationen zur Abschätzung der Genotypen durchgeführt (Browning et al. 2007; Browning et al. 2016). Die Belastbarkeit der Genotypen, die geschätzt wurden, wurde basierend auf dem SSC 17 getestet. Dieses beinhaltet 63.494.081 Basen (2,7 % des Sscrofa-11.1-Genoms) . Aus 1.180.160 Varianten, die entdeckt wurden, konnten 1.100.933 Varianten alle Filter durchlaufen, und bei 456.550 Varianten traten keine fehlenden Genotypen auf. Aus diesen 456.550 Varianten ohne fehlende Genotypen wurden randomisiert 2000 Varianten ausgewählt, und jede zweite der 2000 ausgewählten Varianten aus allen in der Imputation verwendeten Tieren wurde auf fehlend („missing“) gesetzt und anschließend wiederum mit dem Programm Beagle Version 4.1 mit 15 Iterationen imputiert. Die mittlere Übereinstimmung zwischen den „wahren“ und imputierten Genotypen wurde als Maß der Genauigkeit der Imputation betrachtet und betrug 0,9786. Somit galt die Imputation als robust.

### 3.2.12 Genomweite Assoziationsstudie (GWAS)

Um die erstellten und geprüften Varianten mit dem Phänotyp der Tiere zu assoziieren, wurde das Programm Plink 1.9 verwendet (Purcell et al. 2007); die erstellten VCF-Dateien wurden über ein Python-Skript in ein Plink-Format überführt (Anhang 9.6.1). Nur Varianten mit einer Frequenz des selteneren Allels (*Minor-Allele-Frequency*, MAF)  $> 0,01$ , einem P-Schwellenwert  $> 0,001$  bezogen auf die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht berechnet durch einen Exact-Test (Wigginton et al. 2005) und einer fehlenden Genotypisierungsrate  $< 0,1$  wurden in die GWAS einbezogen. Es wurden weiterhin Phänotypen-Dateien mit einem qualitativen Phänotyp (Case/Control) sowie mit den jeweils gemessenen Parametern als quantitativem Phänotyp erstellt. Die eigentliche Assoziationsstudie erfolgte im Falle des qualitativen Phänotyps mittels des exakten Fisher-Tests, also einem Modell mit fixem Effekt in einer Kontingenztafel mit einem Freiheitsgrad (1 df), wobei ebenfalls rezessive und dominante Modelle überprüft wurden. Weiterhin erfolgte ein Cochran-

Armitage-Trend-Test (Cochran 1954). Die einbezogenen quantitativen Phänotypen wurden über eine lineare Regression ausgetestet. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde ein Python-Skript zur Erstellung von Manhattan-Plots und Quantile-Quantile-Plots verwendet (Anhang 9.6.2 und 9.6.3). Um dem Problem des multiplen Testens Rechnung zu tragen, das insbesondere in genomweiten Assoziationsstudien mit vielen Markern eine Rolle spielt, wurde sowohl eine Korrektur der Signifikanzschwelle nach Bonferroni vorgenommen (Johnson et al. 2010) als auch eine Korrektur der Signifikanzschwelle nach Benjamini (1995) in Form der *False-Discovery-Rate* angewandt. Bei der Bonferroni-Korrektur wird die Signifikanzschwelle (hier mit einem Wert von 0,05) analog zu den durchgeführten Tests angehoben (*Signifikanzschwelle* = 0,05 / *Anzahl der eingesetzten Marker*). Die *False-Discovery-Rate* hingegen erscheint weniger konservativ und richtet sich gegen die als falsch zurückgewiesenen Nullhypothesen. Dabei spielen ebenfalls die einzelnen P-Werte der Varianten innerhalb der Benjamin-Hochberg-Prozedur und ihre Verteilung eine Rolle (Benjamini Y 1995). Es gilt die Formel:  
$$FDR = E(V/R \mid R > 0) P(R > 0)$$
, wobei V die Anzahl der Typ-1-Fehler (falsch-positiv) darstellt und R die Anzahl der verworfenen Hypothesen ist (Reiss et al. 2012).

Das Kopplungsungleichgewicht zwischen den Varianten erfolgte über das Programm Haploview (Barrett et al. 2005). Dabei werden die beiden Kopplungsungleichgewichtskoeffizienten  $D'$  und  $r^2$  vom Programm paarweise für die einzelnen SNPs berechnet sowie graphisch in Form einer Kopplungskarte dargestellt, die innerhalb der eingegangenen SNPs Kopplungsungleichgewichte und Kopplungsgruppen anhand von Haplotypenblöcken aufzeigt.  $D'$  beschreibt dabei den standardisierten D-Wert, der wiederum den Unterschied der tatsächlichen und der erwarteten Gametenfrequenz an zwei voneinander unabhängigen Genloci angibt (Mueller 2004). Der Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$  wird ebenfalls in Form von  $r^2$  genutzt (Mueller 2004). Werte, die zu 1 tendieren, zeigen ein hohes Kopplungsungleichgewicht und somit eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass sie gemeinsam vererbt werden.

### 3.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine von Karry Banks Mullis und Michael Smith im Jahre 1983 entwickelte Methode zur spezifischen Amplifikation von ausgewählten Abschnitten einer DNA-Sequenz. Die Schlüsselentdeckung zur Durchführung der PCR war eine hitzestabile Polymerase, die

Taq-Polymerase aus dem gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus*. Die PCR besteht aus drei Schritten, die zusammengenommen einen Zyklus ergeben. Zur Amplifikation des DNA-Abschnittes werden 25 – 35 Zyklen durchgeführt. Im ersten Schritt wird die DNA bei einer Temperatur von 94 - 96 °C in zwei Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Anschließend lagern sich zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) komplementär an den Positiv- und Negativstrang der DNA (Annealing). Die Anheftung der Primer findet bei einer Annealing-Temperatur von 50 – 70 °C statt, abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer. Im dritten Schritt werden die Primer verlängert (Extension, Elongation), indem die Polymerase durch Einbau von Nukleotiden (dNTPs, Desoxynukleosidtriphosphate) den komplementären Strang synthetisiert. Die Elongation findet abhängig von der verwendeten Polymerase bei 68 – 72 °C statt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Anhang: Tabelle 21) wurden mit dem Programm Primer 3 des NCBI ausgewählt. Bei der Auswahl der Primer wurde auf ein GC-Gehalt von 50 – 60 % und eine Länge von 18 - 24 Bp geachtet. Weiterhin sollte die Primersequenz von einem G oder C umschlossen sein und keine repetitiven Basenabfolgen enthalten. Eine Bildung von Dimeren mit sich selbst (Selbstkomplementarität) oder dem jeweils anderen Primer (Primer-Dimere) sollte vermieden werden.

Alle PCRs wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt, bestehend aus 2x Qiagen Multiplex Mastermix, Auftragspuffer, Primer, Wasser und DNA (Tab. 5). Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 5 - Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion

Reagenzien	Volumen [µl]	Endkonzentration
Master Mix (2X)	5	1x
Wasser	2	-
Auftragspuffer	1	1x
Primer Mix (Forward und Reverse Primer)	1	0,4 µM
DNA (50 ng)	1	5 ng/µl

Tabelle 6 - Reaktionsbedingungen für die Polymerase-Kettenreaktion

Schritt	Temperatur	Dauer	PCR-Schritt	Zyklen
1	94°C	15 min	Aktivierung der Taq-DNA-Polymerase	1
2	94°C	30 sec	Denaturierung	25-35
3	50-70°C	90 sec	Annealing	
4	72°C	30 sec	Extension	
5	72°C	10 min	Extension	1
6	4°C	∞	Kühlung	

### 3.2.14 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Amplifikate wurden zur Überprüfung der Länge, der Menge und der Spezifität auf einem 1,5%igen Agarosegel bei einer Spannung von 120 V für 20 min aufgetrennt und die Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Das Agarosegel enthielt den Fluoreszenzfarbstoff Midori Green Advance, der sich zwischen die DNA-Doppelstränge lagert und bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert. Als Größenstandard diente eine 100 Bp-Leiter. Die Bilder des Agarosegels wurden über eine Digitalkamera in einen Rechner übertragen und dort archiviert.

### 3.2.15 Sanger-Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden für die Sanger-Sequenzierung enzymatisch aufgereinigt. Dabei wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 0,5 µl Exonuklease I und 1 µl alkalischer Phosphatase versetzt und bei 37°C für 30 min im Thermocycler inkubiert. Die Enzyme wurden anschließend bei 80 °C für 15 min inaktiviert. Exonuklease I baut überschüssige Primer ab und alkalische Phosphatase dephosphoryliert die verbliebenen dNTPs. Für die Sequenzierung wurde zu den enzymatisch behandelten PCR-Produkten 4µl 5µM Primer (Forward oder Reverse, siehe Primerliste im Anhang) gegeben. Die Sequenzierung wurde von LGC Genomics durchgeführt.

### 3.2.16 Kompetitive allelspezifische PCR

Die Kompetitive allelspezifische PCR (KASP, LGC Genomics) stellt eine spezifische Form der PCR dar, die es dem Untersucher erlaubt, über ein Fluoreszenzsignal bialellische Polymorphismen (SNP, Indel) an spezifischen Genorten nachzuweisen. Die Technik wurde von der britischen Firma LGC Genomics entwickelt und patentiert.

Der KASP-Assay enthält 3 verschiedene nicht markierte Primer, zwei Vorwärtsprimer und einen Rückwärtsprimer. Vorwärtsprimer 1 ist spezifisch für Allel A und Vorwärtsprimer 2 spezifisch für Allel B. Der dritte Primer ist der gemeinsame Rückwärtsprimer für beide Vorwärtsprimer. Zusätzlich zu den spezifischen Sequenzen werden beide Vorwärtsprimer mit einer am 5'-Ende des Primers anhängenden, einzigartigen Sequenz („tail sequence“) synthetisiert. Die anhängenden, einzigartigen Sequenzen sind komplementär zur Sequenz einer FRET-Kassette, die jeweils mit einem HEX- oder einem FAM-Farbstoff markiert sind.

Kann einer der beiden Vorwärts-Primer mit seinem spezifischen Teil an die Sequenz mit dem enthaltenen Polymorphismus binden, wird der Komplementärstrang synthetisiert (Zyklus 1); nur die anhängende, einzigartige Sequenz des Vorwärtsprimers verbleibt als Einzelstrang. Im zweiten und jedem weiteren Zyklus der PCR wird dann auch die anhängende, einzigartige Sequenz des Vorwärtsprimers komplementiert, sodass an diese Sequenz die korrespondierende FRET-Kassette binden kann. Es kommt zur Trennung von Quencher und Fluorophor und damit zum Anstieg des Fluoreszenzsignals. Je nachdem, welches Allel in der Probensequenz vorhanden ist, kommt es bei homozygoten Varianten zu einer HEX- oder FAM-Fluoreszenz. Bei heterozygoten Varianten wird eine gemischte Fluoreszenz emittiert. Die Primer für die KASP-Genotypisierung wurden von LGC Genomics anhand der von uns eingesendeten Sequenz (jeweils 50 Bp vom Polymorphismus entfernt) erstellt und als KASP-Assay zur Verfügung gestellt (Angang Tabelle 22). Weiterhin wurde ein KASP-Mastermix mit den FRET-Kassetten, der Taq-Polymerase, den dNTPs, einem passiven ROX-Farbstoff als Ausgangsreferenz und einer optimierten Puffersubstanz zur Verfügung gestellt.

Die KASP-Genotypisierung wurde in 96-Well-Platten durchgeführt, wobei in jede Vertiefung 5µl des KASP-Mastermixes, 0,14 µl des KASP Assays und 5µl DNA (< 100ng) pipettiert wurden. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie verschlossen. Die weiteren Schritte erfolgten im Real-Time-PCR-Gerät ABI 7300.

Die Grundfluoreszenz wurde bei 35°C gemessen („prerun“). Anschließen wurde ein Thermocyclerprogramm (siehe Tabelle 7) zur Amplifikation durchgeführt. Die entstandene Fluoreszenz wurde daraufhin bei 35°C gemessen.

Tabelle 7 - Reaktionsbedingungen für die KASP-Genotypisierung

Schritt	Temperatur	Dauer	PCR-Schritt	#Zyklen
1	94°C	15 min	Aktivierung der Taq-Polymerase	1
2	94°C	20 sec	Denaturierung	10
	61-55°C (-0,6°C pro Zyklus)	60 sec	Annealing/Extension	
3	94°C	20 sec	Denaturierung	26
	55°C	60 sec	Annealing/Extension	

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Phänotypen der Versuchstiere

Die von uns für diese Studie infizierten Tiere waren vor der Infektion klinisch, sonographisch und röntgenologisch gesund. Sie wurden im Vorfeld über serologische und molekularbiologische Tests auf die Erreger *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, PRRSV und Influenza getestet. Alle Untersuchungsergebnisse waren negativ. Es gab keinerlei Anzeichen von erschwerter Atmung, Dyspnoe und erhöhter Rektaltemperatur.

Nach der Infektion war ein drastischer Anstieg der erfassten klinischen Parameter über den geplanten Zeitraum von sieben Tagen zu erkennen. Am letzten Tag des Infektionsversuches waren bei einigen Tieren hochgradige respiratorische Symptome, schlechtes Allgemeinbefinden und hohes Fieber bis zu 41 °C zu beobachten. In der sonographischen Untersuchung dominierten primär Kometschweifartefakte in Zusammenhang mit Unterbrechungen der echogenen Pleuralinie. Dominierend innerhalb der radiologischen Untersuchung erwiesen sich die zum Teil hochgradig verschattete Bereiche, analog zu multiplen Abszessen und der typischen hämorrhagisch nekrotisierenden Pleuropneumonie, die im Rahmen der durchgeführten Pathologie auffällig wurden.

Im Verlauf des Versuchs sind 36 Tiere bereits vor dem Ablauf des siebentägigen Infektionszeitraums verstorben oder wurden aufgrund der gravierenden klinischen Symptomatik und der Erfüllung der von unserer Arbeitsgruppe festgesetzten Cut-off-Kriterien euthanasiert. Die ermittelten Parameter zeigen allerdings die hohe Variabilität der Schwere der standardisierten Infektion zwischen den verschiedenen Tieren. Der klinische Score erreichte Werte von 0 bis 35, der RHS (Respiratory-Health-Score) zwischen 0,33 und 100. Auch der Lung-Lesion-Score (LLS) variierte zwischen 0 und 35. Für den Re-Isolations-Score konnten alle extremen Ausprägungen von 0 bis 3 (siehe Tabelle 8) festgestellt werden. Die größte Bandbreite wurde für den RHS Score nachgewiesen. Bei einigen Tieren konnten keinerlei Veränderungen nachgewiesen werden.

Tabelle 8 - Klinische, pathologische und mikrobielle Parameter der 163 infizierten Tiere

Parameter	Standard		Minimum	Maximum	Oberes	Unteres
	Mittelwert	Abweichung			CI(95%)	CI(95%)
Klinischer						
Score	8,51	10,59	0	35	10,14	6,88
RoeS	27,53	16,74	0	50	30,10	24,96
SoS	96,91	78,3	0	200	108,93	84,89
RHS	42,61	31,28	0,33	100	47,41	37,81
LLS						
(Sektion)	14,39	10,93	0	35	16,06	12,71
Tod	0,22	0,41	0	1	0,28	0,16
RelsoL	1,74	0,95	0	3	1,88	1,59

RoeS: Röntgen-Score; SoS: Sonographischer Score; RHS: Respiratory Health Score; LLS: Lung-Lesion-Score; Tod: Versterben vor Tag 7 der Infektion; RelsoL: Re-Isolations-Score; CI: Confidence-Interval.

Die hohe Bedeutung des RHS zur Charakterisierung des gesamten Krankheitsgeschehens ergibt sich aus Korrelationen mit den Werten der übrigen Parameter und Scores zwischen 0,72 und 0,92. Dabei wurden zwischen 52,3 % (RelsoL) und 85,4 % (SoS) der Varianz der jeweiligen klinischen Werte und Scores durch den RHS erklärt (Tabelle 9). Alle Werte der Phänotypisierung folgten der Normalverteilung.

Tabelle 9 - Pearson-Korrelationen zwischen klinischen, pathologischen und mikrobiologischen Werten der 163 infizierten Schweine

	Klinischer					
	Tod	Score	RoeS	SoS	LLS	RelSol
Klinischer						
Score	0,96					
RoeS	0,715	0,746				
SoS	0,701	0,741	0,75			
LLS	0,695	0,696	0,751	0,73		
RelSol	0,507	0,565	0,696	0,7	0,633	
RHS	0,857	0,898	0,91	0,924	0,797	0,723
Durch den RHS erklärte Varianz (%)	73,4	80,6	82,8	85,4	63,6	52,3

Alle Korrelationen waren mit einem P-Wert  $\leq 0,001$  statistisch signifikant.

RoeS: Röntgen-Score; SoS: Sonographischer Score; RHS: Respiratory Health Score; LLS: Lung-Lesion-Score; Tod: Versterben vor Tag 7 der Infektion; RelSol: Re-Isolations-Score; CI: Confidence-Interval.

Für die Genomweite Sequenzierung wurde DNA aus EDTA-gerinnungsgehemmtem Vollblut von 74 Tieren extrahiert. Hierfür wurden aus dem Gesamtkollektiv von 163 phänotypisierten Tieren anhand des RH-Scores und des Sektions-Scores 37 Tiere ausgewählt, die sich als besonders empfindlich gegenüber der Infektion mit *A. pleuropneumoniae* zeigten (Tabelle 10, empfindlich, Abbildung 6+7), und 37 Tiere, die sich als besonders resistent erwiesen hatten (Tabelle 10, resistent, Abbildung 6+7). Die je 37 empfindlichen und resistenten Schweine zeigten sich als signifikant unterschiedlich in nahezu allen erfassten klinischen Werten bei einem P-Wert  $\leq 0,0001$  (Tabelle 10). Lediglich die Tiere, die vor Tag 7 verstorben waren oder eingeschlafert werden mussten, zeigten keinen Unterschied zwischen Tieren mit intermediärem und hochgradigem RHS. Eine Übersicht über alle gemessenen klinischen Parameter zeigen die Abbildungen 22 – 26 im Anhang.

Tabelle 10 - Einteilung der Tiere in resistent, intermediär und empfindlich sowie die dazu korrespondierenden Werte

Merkmal	Resistent (n=37)		Intermediär (n=89)		Empfindlich (n=37)	
	Mittelwert	SF	Mittelwert	SF	Mittelwert	SF
Klinik Score	1,27	0,13	5,44	1,22	23,14	1,62
RoeS	8,84	1,08	26,65	1,62	48,32	2,13
SoS	11,84	4,47	93,35	7,88	190,54	8,17
RHS	9,08	1,41	38,50	3,37	86,02	2,92
LLS	1,64	0,3	13,00	1,1	30,47	0,85
RelsoL	0,59	0,12	1,86	0,68	2,59	0,09
Tod	0	0	0,06	0,08	0,84	0,06

RoeS: Röntgen-Score; SoS: Sonographischer Score; RHS: Respiratory Health Score; LLS: Lung-Lesion-Score; Tod: Versterben vor Tag 7 der Infektion; RelsoL: Re-Isolations-Score

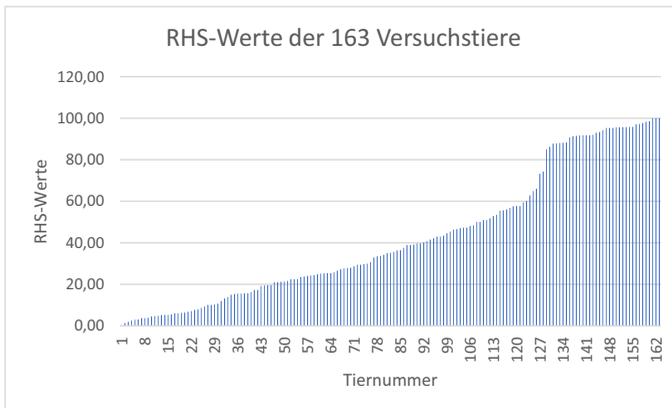


Abbildung 6 - Die RHS-Werte - auf der y-Achse aufgetragen gegen die 163 infizierten phänotypisierten Tiere auf der x-Achse.

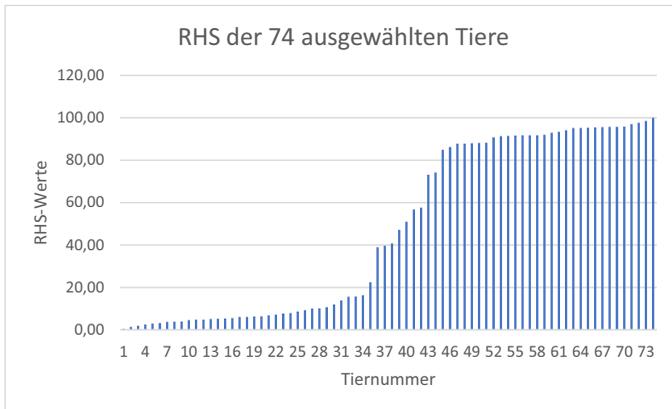


Abbildung 7 - Die RHS-Werte - auf der y-Achse aufgetragen gegen die 74 zur Sequenzierung ausgewählten Tiere auf der x-Achse.

## 4.2 Genomweite Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden die jeweils 37 Tiere mit den extremsten RH- und Sektions-Scores verwendet (Tabelle 10, Abbildung 6+7). Die Sequenzierung erfolgte als sogenannte Paired-End-Sequenzierung, und die ausgewählten Proben wurden mit einer durchschnittlichen Abdeckung von 10,17 sequenziert (Abbildung 8, Anhang Tabelle 18). Allerdings sind darin zwei Tiergruppen mit 6-facher bzw. 11-facher Abdeckung enthalten. Die geringere Abdeckung wurde bewusst gewählt, um Kosten einzusparen. Die fehlenden Daten wurden über das Programm Beagle 4.1 sowie die Sequenzdaten einer bereits sequenzierte DL-Referenzpopulation implementiert (ergänzt).

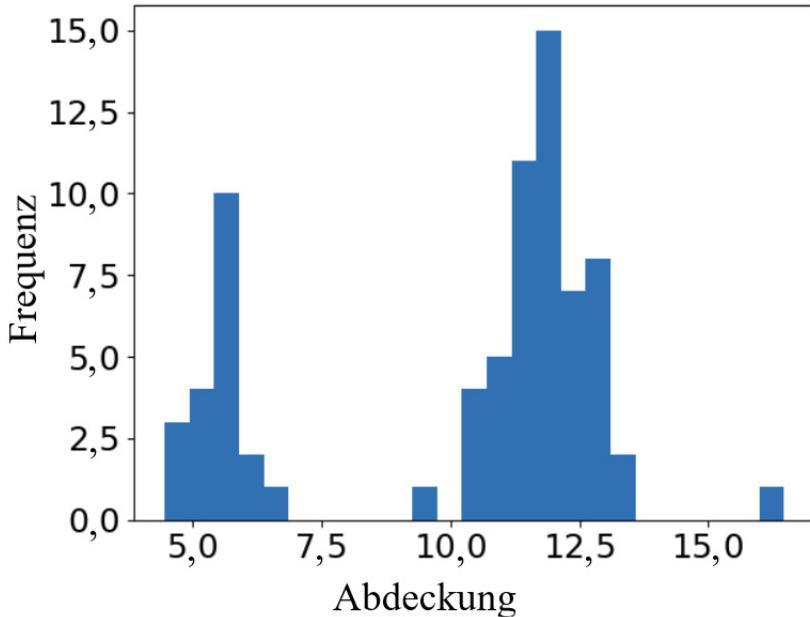


Abbildung 8 Abdeckung der Sequenzen der 74 sequenzierten Tiere

Die y-Achse enthält die Anzahl Tiere, die x-Achse den Abdeckungsgrad der Sequenzierung.

Wir konnten 25,72 Millionen Varianten entdecken, ohne die Daten zu imputieren und weitere Filter anzuwenden. Nach Bearbeitung der Ergebnisse mit den beschriebenen GATK-Filtern und Imputation der verbliebenen Varianten mittels Beagle verblieben 23,197 Millionen Varianten. Im Rahmen der genomweiten Assoziationsstudie wurde mit Hilfe des Programmes Plink die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft (Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) der einzelnen Marker mittels eines Exact-Tests [alle Marker mit einem HWE-Wert  $\leq 0,001$  wurden herausgefiltert]). Hierzu wurde eine Minimalfrequenz für das seltenere Allel von 0,01 (MAF) festgelegt, um falsch-positive Varianten weitgehend auszuschließen. In der genomweiten Assoziationsstudie wurden schließlich 17.258.160 Varianten berücksichtigt.

### 4.3 Genomweite Assoziationsstudie

Die genomweite Assoziationsstudie (GWAS) basierte anfangs auf den anhand von RHS und Sektions-Score als besonders empfindlich (n=37) und besonders resistent (n=37) eingestuften Tieren (Tabelle 10). Die Empfindlichkeit wurde als qualitativer Phänotyp kodiert (1 oder 2). Zusätzlich wurden alle erhobenen quantitativen klinischen Merkmale untersucht. Im ersten Schritt wurde mit Hilfe des exakten Fisher-Tests eine grundlegende Assoziation der Phänotypen mit den Genotypen überprüft. Danach wurden Assoziationstests mit unterschiedlichen genetischen Modellen durchgeführt, bei denen das Resistenzallel als dominant oder rezessiv angenommen wird.

Nach der Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni (Johnson et al. 2010) und anhand der False-Discovery-Rate (Benjamini Y 1995) waren Ausschläge innerhalb der Signifikanz verschiedener SNPs zum definierten Phänotyp basierend auf dem RHS-Wert auf den Chromosomen 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 15 und 16 sichtbar (Abbildung 9). Diese waren jedoch unterhalb der Signifikanzgrenze nach Bonferroni ( $2,84 \cdot 10^{-9}$ ).

Die vollständigen Manhattan-Plots und Q-Q-Plots sind im Anhang zu finden (9.3.1 – 9.3.5). Um die eventuell in den Daten vorhandenen systematischen Stratifikationen aufzudecken, wurden Q-Q-Plots und die zugehörige genomische Inflation berechnet. Es zeigten sich keine Lambda-Werte  $\geq 1$ . Somit konnten Stratifikationen vernachlässigt werden.

## Ergebnisse

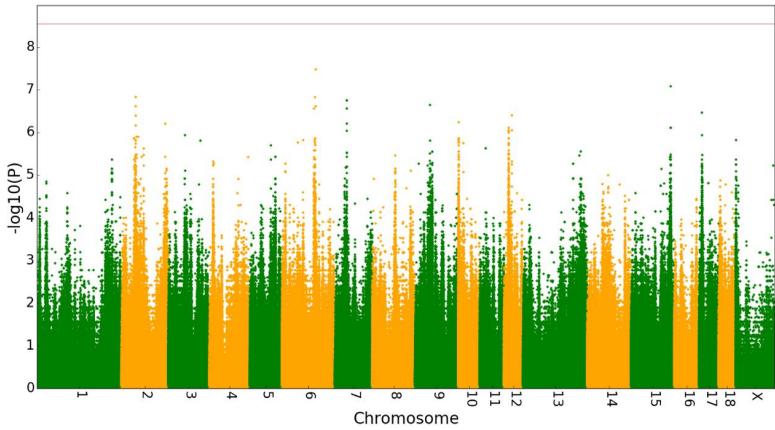


Abbildung 9 - Manhattan-Plot des qualitativen Phänotyps und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere - die jeweiligen Chromosomen sind auf der x-Achse aufgetragen und der negative dekadische Logarithmus des P-Wertes der einzelnen Varianten ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Signifikanzschwelle lag bei  $2,84 \cdot 10^{-9}$  (rote horizontale Linie).

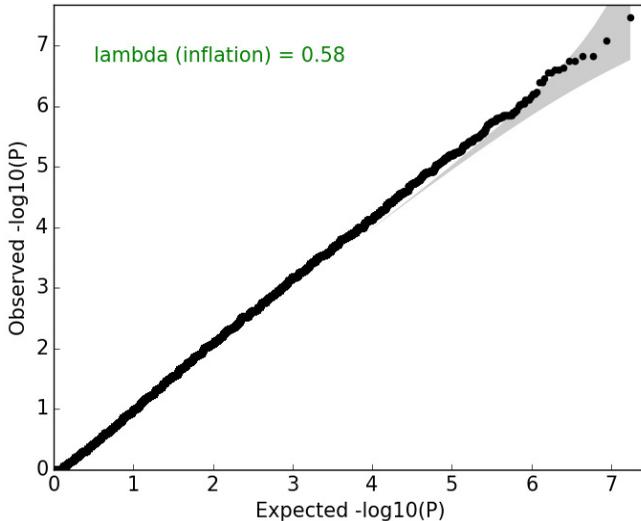


Abbildung 10 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des qualitativen Phänotyps und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere - der erwartete und beobachtete negative dekadische Logarithmus des P-Wertes der einzelnen Varianten sind jeweils gegeneinander aufgetragen. Die genomische Inflation Lambda wird ebenfalls angezeigt.

Somit wurden die Tiere anhand des RHS-Wertes auf 21 resistente nicht bis kaum betroffene Tiere, 105 intermediär betroffene Tiere und 37 stark betroffene Tiere eingegrenzt (Tabelle 11, Abbildung 11).

Dabei waren im Gegensatz zu den empfindlichen Tieren die resistenten kaum von den intermediären Tieren abzugrenzen. Da bei intermediären Tieren jedoch ursächlich von einer größeren Vielfalt an involvierten Genen ausgegangen werden muss, wurden die resistenten Tiere für die GWAS sehr restriktiv anhand von Steigungsänderungen im Verlauf des RHS-Wertes ausgewählt, wobei nach Tier 21 sortiert nach dem RHS eine erhöhte Steigung erkennbar war (Abbildung 11 und 12). Es wurden die 21 resistentesten Tiere ausgewählt und den 37 empfindlichen Tieren gegenübergestellt. Die Assoziationsstudie ergab dabei signifikante Beziehungen (nach FDR-Korrektur;  $P < 0.05$ ) von SNPs auf den Chromosomen 2, 12 und 15 (Abbildung 13) sowie einzelne Varianten auf den Chromosomen 16, 18 und X. Es zeigten sich keine Lambda-Werte  $\geq 1$  im Q-Q-Plot (Abbildung 14). Somit konnten wir davon ausgehen, dass keinerlei Stratifikation innerhalb der verwendeten Daten vorhanden war.

Tabelle 11 - Einteilung der Tiere in resistent, intermediär und empfindlich sowie die dazu korrespondierenden Werte (58 Tiere)

Trait	Resistent (n=21)		Intermediär (n=105)		Empfindlich (n=37)	
	Mittelwert	SF	Mittelwert	SF	Mittelwert	SF
Klinik Score	0.95	0.08	4.87	0.64	23.14	1.55
RoeS	4.48	0.4	24.81	1.2	48.32	1.1
SoS	2.43	0.63	82.81	6.32	190.54	4.34
RHS	4.3	0.28	34.97	2	86.02	2.5
LLS	1.29	0.31	11.34	0.63	30.47	0.8
Relsol	0.27	0.05	1.73	0.07	2.59	0.1
Tod	0	0	0.05	0.02	0.84	0.06

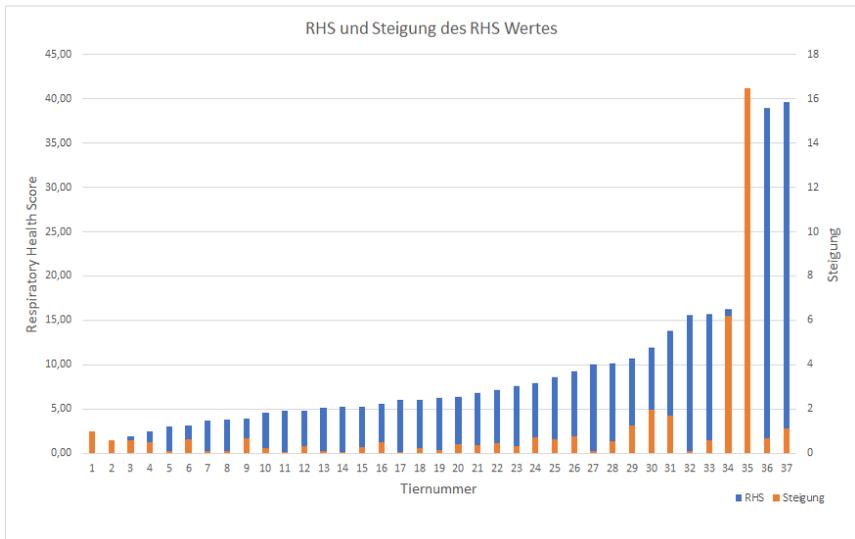


Abbildung 11 - Vergleich des RHS-Wertes der 37 als resistent angenommenen Tiere (y-Achse, links – blaue Säulen) mit der jeweiligen Steigung die zwischen den einzelnen Tieren (y-Achse, rechts – orange Säulen). Auf der x-Achse ist die Tiernummer nach aufsteigendem RHS-Wert aufgetragen.

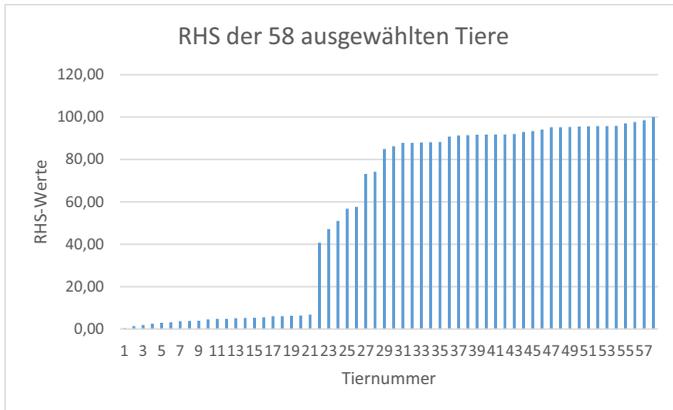


Abbildung 12 – RHS-Werte der 58 ausgewählten Tiere (21 resistent, 37 empfindlich)

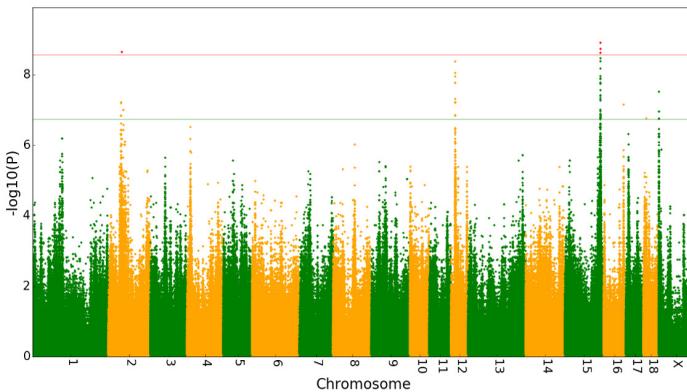


Abbildung 13 - Manhattan-Plot mit dem qualitativen Phänotyp und 21 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren - Auf der x-Achse sind die Chromosomen und auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus des P-Wertes dargestellt. Die rote horizontale Linie beschreibt die Signifikanzschwelle nach Bonferroni-Korrektur und die grüne horizontale Linie zeigt die Signifikanzschwelle nach False-Discovery-Rate.

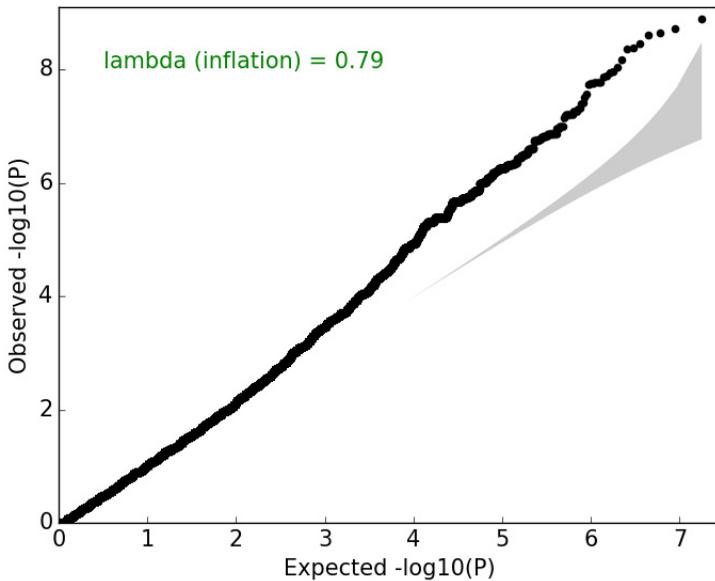


Abbildung 14 - Q-Q-Plot zugehörig zu Abbildung 13 - Der erwartete negative dekadische Logarithmus des P-Wertes ist auf der x-Achse und der beobachtete negative dekadische Logarithmus des P-Wertes ist auf der y-Achse aufgetragen. Die genomische Inflation Lambda wird ebenfalls als Wert angegeben.

#### 4.4 Annotation und kodierende Varianten

Über das Programm Variant Effect Predictor (VEP) von Ensembl wurden die Varianten annotiert und somit ihre eventuelle Position innerhalb von Genen sowie ihre Auswirkungen auf die Transkription dieser Gene bestimmt. Im nächsten Schritt konnten aus den 17 Millionen Varianten, die in die Assoziationsstudie eingegangen waren, 783.569 Varianten im kodierenden Bereich des Schweinegenoms herausgefiltert und durch eine weitere Assoziationsstudie eine signifikant mit dem qualitativen Phänotyp assoziierte Variante auf SSC15 mit einem p-Wert von  $3,806e-8$  identifiziert werden (15\_128476618; Abb. 15 und 16, Tabelle 12), die auch innerhalb der Assoziationsstudie mit

allen Varianten nach FDR signifikant assoziiert war. Die Variante befindet sich im 3'-UTR Bereich des Collagen-IV-Gens (COL4A4).

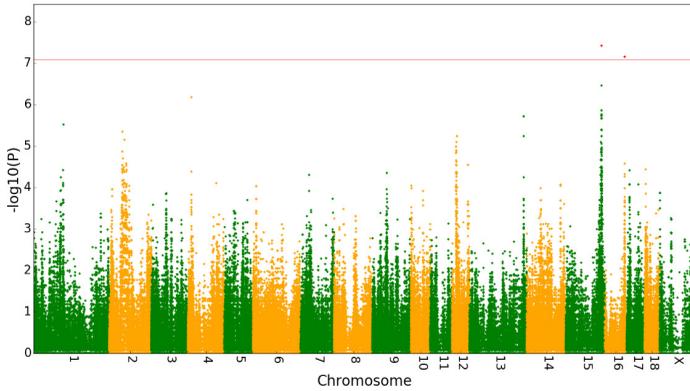


Abbildung 15 - Manhattan-Plot mit dem qualitativen Phänotyp und 21 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren - Die rote Linie markiert die Signifikanzgrenze (0,05) nach Bonferroni-Korrektur. Auf der x-Achse sind die Chromosomen und auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus des P-Wertes dargestellt.

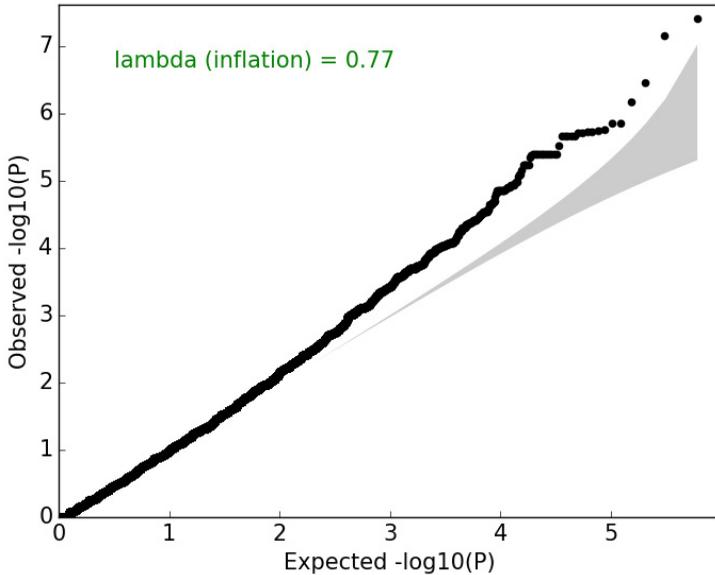


Abbildung 16 - Q-Q-Plot zu Abbildung 15

Die nach Bonferroni-Korrektur und False-Discovery-Rate signifikanten Varianten sind in der Tabelle 12 dargestellt, wobei lediglich ein Teil der SNPs validiert wurde. Eine Variante auf Chromosom 15 (15\_128471464) war genomweit signifikant ( $P=1,24 \times 10^{-9}$ ) (Tabelle 12). Ein Hauptanteil der SNPs liegt in Intron-Bereichen von Genen auf Chromosom 2 (F-Spondin-Gen [*SPON1*]), Chromosom 12 (Platelet- and-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule-1-Gen [*PECAM1*]) und Chromosom 15 (Collagen-Type-IV-Gen [*COL4A4*; *COL4A3*] sowie Rhomboid-Domain-Containing-Protein-1 [*RHBDD1*]; Tabelle 12 und 13). Einzelne signifikant assoziierte Varianten liegen zusätzlich auf Chromosom 16, 18 und X. Um die zu validierenden Varianten einzugrenzen und eine sinnvolle Auswahl der signifikant mit dem Phänotyp assoziierten Varianten treffen zu können, wurden Lage und Funktion der Varianten innerhalb der Gene und die mögliche funktionelle Bedeutung der Gene im Pathogenitätsmechanismus herangezogen (Tabelle 13).

Ergebnisse

Tabelle 12 - Signifikant mit dem Phänotyp „resistent“ oder „empfindlich“ assoziierte Varianten nach exaktem Fisher-Test

CHR	SNP	BP	AI	FA	F_U	AZ	P	OR	BOINF	HOMI	SIDAK_SS	SIDAK_SD	FDR_BH	FDR_BY
2	<b>2_4502456***</b>	4502456	C	0,5811	0,09524	CTT		1,46E-007	13,18	1	0,962	0,962	0,04899	0,7082
2	2_45727728	45727728	C	0,5946	0,09524	T		6,08E-008	13,93	1	0,6626	0,6626	0,03271	0,565
2	<b>2_45729307*</b>	45729307	T	0,6351	0,119	G		6,41E-008	12,88	1	0,8317	0,6637	0,03271	0,565
2	<b>2_48481895*</b>	48481895	GGT	0,5811	0,04762	G		2,27E-009	27,74	0,04068	0,09377	0,03977	0,01066	0,1842
2	2_5_090949	5490949	TA	0,2973	0,8095	T		1,00E-007	0,09955	1	0,8328	0,8328	0,04099	0,7082
2	2_5_090952	5490952	A	0,2973	0,8095	AC		1,00E-007	0,09955	1	0,8328	0,8328	0,04099	0,7082
12	<b>12_14641621*</b>	14641621	G	0,6081	0,07143	A		4,21E-009	20,17	0,07513	0,07237	0,07237	0,01073	0,1854
12	12_14641668	14641668	C	0,5541	0,04762	T		8,91E-009	24,85	0,1591	0,4471	0,4471	0,01693	0,2925
12	12_14644923	14644923	C	0,5946	0,07143	T		1,13E-008	19,07	0,1995	0,8099	0,1809	0,01893	0,2925
12	12_14644939	14644939	A	0,5811	0,07143	C		1,71E-008	18,03	0,3047	0,8627	0,2627	0,01693	0,2925
12	12_14644987	14644987	GC	0,5811	0,07143	G		1,71E-008	18,03	0,3047	0,8627	0,2627	0,01693	0,2925
12	12_14645062	14645062	T	0,5946	0,09524	C		6,08E-008	13,93	1	0,6626	0,6626	0,03271	0,565
12	12_14645063	14645063	T	0,5946	0,09524	C		6,08E-008	13,93	1	0,6626	0,6626	0,03271	0,565
12	12_14645064	14645064	A	0,5946	0,09524	G		6,08E-008	13,93	1	0,6626	0,6626	0,03271	0,565
12	<b>12_14645074*</b>	14645074	C	0,6081	0,09524	G		4,86E-008	14,74	0,8686	0,5804	0,5804	0,03271	0,565
12	12_14645079	14645079	T	0,5946	0,09524	C		6,08E-008	13,93	1	0,6626	0,6626	0,03271	0,565
12	12_14645083	14645083	G	0,4595	0,02381	A		1,40E-007	94,85	1	0,9378	0,9378	0,04099	0,7082
12	12_14646288	14646288	C	0,473	0,02381	T		6,23E-008	36,79	1	0,6712	0,6712	0,03271	0,565
15	15_128210989	128210989	A	0,2027	0,7143	G		9,94E-008	0,1017	1	0,8306	0,8306	0,04099	0,7082
15	15_128211931	128211931	A	0,2027	0,7143	C		9,94E-008	0,1017	1	0,8306	0,8306	0,04099	0,7082
15	15_12835290	12835290	T	0,1216	0,952	C		1,38E-007	0,8415	1	0,9075	0,9075	0,04899	0,7082

Ergebnisse

Tabelle 12 (fortgesetzt) - Signifikant mit dem Phänotyp „resistent“ oder „empfindlich“ assoziierte Varianten nach exaktem Fisher-Test

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	P	OR	BOFIF	HOIM	SIDAK_SS	SIDAK_SD	FDR_BH	FDR_BY
15	15_128335348	128335348	T	0,09459	0,5714	C		4,69E-008	0,07836	0,8372	0,8671	0,5671	0,03271	0,565
15	15_128335361	128335361	G	0,1081	0,619	A		1,69E-008	0,07459	0,3008	0,2597	0,2597	0,01693	0,2925
15	15_128335367	128335367	C	0,1081	0,619	A		1,69E-008	0,07459	0,3008	0,2597	0,2597	0,01693	0,2925
15	15_128335375	128335375	C	0,1081	0,619	T		1,69E-008	0,07459	0,3008	0,2597	0,2597	0,01693	0,2925
15	15_128371140	128371140	C	0,04054	0,4524	T		1,10E-007	0,05115	1	0,86885	0,86885	0,04099	0,7082
15	15_128373118	128373118	G	0,06757	0,5476	A		1,27E-008	0,05986	0,2269	0,203	0,203	0,01693	0,2925
15	15_128373223	128373223	A	0,05405	0,5	G		4,04E-008	0,05714	0,7219	0,542	0,542	0,03139	0,5422
15	15_128373275**	128373275	T	0,01351	0,4524	G		2,39E-009	0,01658	0,04265	0,04175	0,04175	0,01066	0,1842
15	15_128380578	128380578	C	0,1081	0,5952	A		5,35E-008	0,08242	0,9552	0,6152	0,6152	0,03271	0,565
15	15_128432657**	128432657	TCAC	0,05405	0,5238	T		1,10E-008	0,05195	0,1959	0,1779	0,1779	0,01693	0,2925
15	15_12844692**	12844692	G	0,08108	0,5714	A		1,32E-008	0,06618	0,2362	0,2104	0,2104	0,01693	0,2925
15	15_128471464	128471464	G	0,1486	0,7143	C		1,24E-009	0,06984	0,02211	0,02187	0,02187	0,01066	0,1842
15	15_128471538	128471538	A	0,2027	0,7619	G		4,15E-009	0,07945	0,07404	0,07137	0,07137	0,01073	0,1854
15	15_128471581	128471581	A	0,1757	0,7143	G		1,81E-008	0,08525	0,3237	0,2765	0,2765	0,01703	0,2943
15	15_128476618**	128476618	A	0,1216	0,619	T		3,81E-008	0,08521	0,6799	0,4933	0,4933	0,03091	0,5339
15	15_128492340	128492340	T	0,1216	0,5952	C		1,33E-007	0,09415	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_128509922	128509922	T	0,2973	0,8571	C		6,68E-009	0,07051	0,1192	0,1124	0,1124	0,01491	0,2575
15	15_128516051	128516051	A	0,1216	0,5952	G		1,33E-007	0,09415	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_128516082	128516082	C	0,1216	0,5952	T		1,33E-007	0,09415	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_128516094	128516094	TA	0,1216	0,5952	T		1,33E-007	0,09415	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_12854233	12854233	C	0,1486	0,6667	G		2,74E-008	0,0873	0,4888	0,3867	0,3867	0,02444	0,4222

Ergebnisse

Tabelle 12 (fortgesetzt) - Signifikant mit dem Phänotyp „resistent“ oder „empfindlich“ assoziierte Varianten nach exaktem Fisher-Test

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	P	OR	BOINF	HOIM	SIDAK_SS	SIDAK_SD	FDR_BH	FDR_BY
15	15_128643830	128643830	G	0,1216	0,9552	A	1,33E-007	0,9415	1	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_128600706	128600706	G	0,08208	0,9552	A	3,41E-009	0,06	0,06095	0,06095	0,05913	0,05913	0,01073	0,1854
15	15_128601518	128601518	T	0,1081	0,9552	C	5,39E-008	0,08242	0,9552	0,9552	0,6152	0,6152	0,03271	0,565
15	15_128601744	128601744	T	0,1081	0,9552	A	5,39E-008	0,08242	0,9552	0,9552	0,6152	0,6152	0,03271	0,565
15	15_128613886	128613886	A	0,1216	0,9552	G	1,33E-007	0,09415	1	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_128616681	128616681	C	0,1216	0,9552	G	1,33E-007	0,09415	1	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_128616889	128616889	C	0,1216	0,9552	T	1,33E-007	0,09415	1	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_128644809	128644809	ACC	0,1216	0,9552	A	1,33E-007	0,09415	1	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_128644810	128644810	C	0,1216	0,9552	A	1,33E-007	0,09415	1	1	0,9075	0,9075	0,04099	0,7082
15	15_128656271	128656271	T	0,1351	0,6905	C	1,89E-009	0,07004	0,03304	0,03304	0,0325	0,0325	0,01066	0,1842
16	16_71734930	71734930	G	0,02703	0,4286	A	7,03E-008	0,03704	1	1	0,7152	0,7152	0,03449	0,6028
19	X_318252	318252	G	0,1892	0,6905	T	1,11E-007	0,1046	1	1	0,8617	0,8617	0,04099	0,7082
19	X_318265	318265	A	0,1892	0,6905	C	1,11E-007	0,1046	1	1	0,8617	0,8617	0,04099	0,7082
19	X_319166	319166	C	0,1892	0,7143	T	3,03E-008	0,09333	0,5419	0,5419	0,4184	0,4184	0,0258	0,4458

\* validiert über Sanger-Sequenzierung

\*\* validiert über KASP-Genotypisierung

\*\*\* andere Variante im Kopplungsgleichgewicht validiert (2\_45022788) über Sanger-Sequenzierung

CHR: Chromosom

BP: genetische Position

A1: Minor Allel

HOLM: Holm (1979) korrigierte p-Werte

SIDAK\_SS: Sidak single-step korrigierte p-Werte

SIDAK\_SD: Sidak step-down korrigierte p-Werte

FDR\_BH: Benjamini & Hochberg (1995) step-up FDR control

FDR\_BY: Benjamini & Yekutieli (2001) step-up FDR control

A2: Major Allel

F\_A\_: Frequenz von Allele 1 in den betroffenen Tieren (Case)

F\_U\_: Frequenz von Allele 1 in den nicht betroffenen Tieren (Control)

P: p-Wert

OR: Odds Ratio

BOINF: Bonferroni korrigierte p-Werte

Tabelle 13 - Signifikante Varianten; mit dem „Variant Effect Predictor“ annotiert

Rs-Nummer	Chromosom	Position	Referenz		Variante	Mutation	FDR-BH	P-Wert	Gen
			Allel	Alternierendes Allel					
rs332803837	2	45022788	C	T	SNP	Intron Variant	0,04*	1,459E-7*	SPON1
neu**	2	45729907	T	G	SNP	intergenic variant	0,03271	6,41E-08	-
rs340627461	2	46394508	T	C	SNP	Intergenic variant	0,1129	1,36E-005	-
rs346247153	2	46394689	A	G	SNP	Intergenic variant	0,1685	2,90E-005	-
rs695978208	2	48481895	-	GT	Insertion	intergenic variant	0,01066	2,27E-009	-
neu**	12	14641621	G	A	SNP	intron variant	0,01073	4,21E-009	PECAM1
neu**	12	14645074	C	G	SNP	Intron Variant	0,03	4,86E-08	PECAM1
rs1113056067	15	128474702	G	T	SNP	variant/downstream intron	0,05984	1,38E-006	RHBDD1/COL4A4
neu**	15	128474183	AC	A	Deletion	intron variant/3 prime UTR variant	0,05984	2,13E-006	RHBDD1/COL4A4
rs322153446	15	128373275	G	T	SNP	intron variant	0,01066	2,39E-009	RHBDD1
rs328863385	15	128446992	A	G	SNP	intron variant	0,01693	1,32E-008	RHBDD1
neu**	15	128432657	-	CAC	Insertion	intron variant	0,01693	1,10E-008	RHBDD1
rs339180611	15	128476618	A	T	SNP	3 prime UTR Variant	0,03	3,81E-08	COL4A4
rs337426966	15	128600706	A	G	SNP	Intron Variant	0,01	3,41E-09	COL4A4

\*p-Wert von rs111488368 gekoppelt mit rs332803837

\*\* keine rs-Nummer vorhanden

Die in Tabelle 12 gezeigten Varianten wurden mittels Sanger-Sequenzierung als Goldstandard oder mit Hilfe der KASP-Genotypisierung validiert. Dabei zeigten sich etliche Abweichungen mit Blick auf die NGS. Die verwendeten Primer, die für die Sequenzierung der Varianten bzw. die zugrunde gelegten Sequenzen verwendet wurden, sind im Anhang zu finden (Tabelle 21 und 22).

Für die validierten Genotypen wurden anschließend die Assoziationen mit den vorliegenden Phänotypen und die Schätzer für die einzelnen Genotypen und Allele berechnet (Tabelle 14). Die dargestellten Varianten (Tabelle 14) auf den Chromosomen 2, 12 und 15 zeigten signifikante Auswirkungen auf die phänotypischen Merkmale. Unter den homozygoten Trägern der günstigen Genvariante auf SSC 15 traten keinerlei Todesfälle auf (Tabelle 14).

Tabelle 14 - Sanger- und KASP-validierte Varianten mit den Genotypen und den korrespondierenden gemessenen Parametern

Rs-Nummer	SSC	Position	Genotyp	Median Klinik	Standart- abweichung Klinik	Median SeS	Standart- abweichung SeS	Median RoSeS	Standart- abweichung RoSeS	Median RHS	Standart- abweichung RHS	Median Sektion	Standart- abweichung Sektion	Median Tod	Standart- abweichung Tod	Median ReSol.	Standart- abweichung ReSol.
rs332803837	2	45022788	0 (C/C) 1 (C/T)	13,17 26,18	13,64 12,06	142 200	98,85 76,27	50 19,66	19,66 16,64	69,54 91,6	40,76 33,82	22,73 29,94	14,99 12,23	0,5 1	0,55 0,45	1,5 2,67	0,94 1,07
neu	2	45729907	2 (T/T) 0 (T/T)	1,5 13,17	9,48 13,57	5,5 142	77,4 98,85	7,5 50	18,15 19,94	7 69,54	32,7 40,85	1,99 22,73	13,64 14,89	0 0,5	0,37 0,55	0,56 1,5	1,14 1,13
neu	2	45729907	1 (T/G) 2 (G/G)	25,7 1,5	12,81 10,55	200 6	85,23 83,36	50 19,37	18,52 19,37	91,15 8,58	37,38 35,6	29,77 2,38	13,31 14,34	1 0	0,48 0,41	2,67 0,62	1,15 1,18
rs340627461	2	46394508	0 (T/T) 1 (T/C)	13,17 25,37	13,57 12,98	142 200	98,85 87,94	50 19	19,94 19	69,54 90,83	40,85 38,39	22,73 29,77	14,89 13,69	0,5 1	0,55 0,49	1,5 2,67	1,13 1,18
rs346247153	2	46394689	0 (A/A) 2 (G/G)	13,17 1,2	13,57 10,55	142 6	98,85 83,36	50 19,37	19,94 19,37	69,54 8,58	40,85 35,6	22,73 2,38	14,89 14,34	0,5 0	0,55 0,41	1,5 0,62	1,13 1,18
rs695978208	2	48481895	0 (V/-) 1 (-/GT)	1,2 1,65	10,91 11,99	2 7	87,31 89,91	6 14,5	21,84 20,29	6,38 11,27	38,54 38,48	0,53 3,37	14,94 14,2	0 0	0,44 0,45	0,44 0,78	1,3 1,23
neu	12	14641621	0 (G/G) 1 (A/G)	26,03 29,55	12,31 4,21	200 200	76,79 0	50 0	17,2 0	91,46 94,81	34,64 4,02	30,1 29,25	12,75 8,13	1 1	0,47 0	2,56 2,78	0,96 0,16
neu	12	14645074	0 (C/C) 1 (C/G)	22,53 0,9	13,05 11,05	200 6	86,42 88,56	50 10	18,85 20,2	88,13 7,76	37,93 37,47	28,22 2,29	13,73 13,83	1 0	0,5 0,44	2,44 0,62	1,1 1,21
rs1113056067	15	128474702	0 (G/G) 1 (G/T)	20,6 1,77	13,18 12,33	200 7	90,26 97,74	50 9,5	19,13 21,55	86,3 7,38	39,13 41,26	24,35 4,17	14,69 15,32	1 0	0,5 0,48	2,56 0,78	1,14 1,27
neu	15	128474183	0 (C/C) 1 (C/-)	1,33 4	0,81 0,78	6 2	15,03 14,83	4 5	8,23 7,67	4,87 5,21	7,51 7,06	1,64 0,98	2,16 2,12	0 0	0 0	0,33 0,44	0,55 0,51
			2 (-/-)	6,83	13,28	200	87,19	50	17,79	73,18	37,03	26,88	14,62	1	0,51	2,56	1,11

Tabelle 14 (fortgesetzt) - Sanger- und KASP-validierte Varianten mit den Genotypen und den korrespondierenden gemessenen Parametern

Re-Nummer	SSC	Position	Genotyp	Median Klinik	Standart- abweichung Klinik	Median SoS	Standart- abweichung SoS	Median RoES	Standart- abweichung RoES	Median RHS	Standart- abweichung RHS	Median Sektion	Standart- abweichung Sektion	Median Tod	Standart- abweichung Tod	Median RelsoI	Standart- abweichung RelsoI
rs32153746	15	128373275	0 (G/G) 1 (G/T)	19,91 1,7	13,15 12,33	200 7	89,39 97,74	50 9,5	19,03 21,55	85,64 7,38	38,67 41,26	24,77 4,17	14,54 15,32	1 0	0,5 0,48	2,56 0,78	1,13 1,27
rs328663385	15	128446992	0 (A/A) 1 (A/G) 2 (G/G)	0,77 1,7 0,9	0,81 12,23 0,83	6 7 6	15,03 89,39 96,89	4 50 9	8,23 19,03 21,53	7,51 85,64 7,14	7,51 38,67 41,04	1,64 24,77 3,08	2,16 14,54 15,22	0 1 0	0 0,5 0,48	0,33 2,56 0,78	0,55 1,13 1,24
neu	15	128432657	0 (V/-) 1 (-/CAC) 2 (CAC/CAC)	19,23 0,77 0,77	13,2 12,43 0,81	200 65,5 6	89,08 98,5 15,03	50 15,5 4	19,11 21,73 8,23	84,98 23,28 4,87	38,64 41,61 7,51	24,35 5,48 2,16	14,49 15,58 2,16	1 0 0	0,51 0,49 0	2,56 1,17 0,33	1,16 1,27 0,55
rs339180611	15	128476618	0 (A/A) 1 (A/T)	0,63 1,5	0,87 12,63	6 6	16,1 96,38	4 9	8,75 21,03	5,21 7,14	7,98 41,05	0,98 3,08	2,27 15,01	0 0	0 0,47	0,44 0,56	0,55 1,28
rs337426966	15	128600706	0 (A/A) 1 (A/G) 2 (G/G)	19,91 1,6 0,65	13,12 12,09 0,75	200 4,5 4	89,03 95,79 5,68	50 10 3,5	18,69 20,88 2,34	85,64 7,35 4,2	38,31 40,3 2,02	24,77 2,29 2,13	14,06 15,31 2,38	1 0 0	0,5 0,47 0	2,62 0,67 0,33	1,04 1,11 0,36

Die Tabelle zeigt die über NGS entdeckten Marker, die signifikant mit dem Phänotyp assoziiert waren. Diese wurden über Sanger-Sequenzierung und KASP-Genotypisierung validiert. Die Genotypen 0 (0/0), 1 (0/1), und 2 (1/1) beschreiben die Allele bezogen auf die Referenzwerte vom Referenzgenom Sus Scrofa 11.1. Die Zahl 0 beschreibt einen homozygoten Genotyp, wobei beide Allele der Referenzsequenz entsprechen, die Zahl 1 einen heterozygoten Genotyp und die Zahl 2 einen homozygoten Genotyp, wobei beide Allele nicht der Referenzsequenz entsprechen. Diese sind in Kombination mit dem Median und der Standardabweichung der verschiedenen Werte für Klinik (Klinik), Sonografie (SoS), Radiologie (RoES), Respiratory-Health-Score (RHS), Pathologie (Sektion), vorzeitiges Versterben (Tod), und den mikrobiologischen Re-Isolations-Score (RelsoI) in der Tabelle dargestellt.

Die SNPs auf SSC 2 (2\_45022788), 12 (12\_14641621) und 15 (15\_128476618) erklärten einzeln bis zu 33 % der Varianz. Die entsprechenden erklärten Varianzanteile lagen für die SNPs auf SSC12, 15 und 2 bei 19,9, 18,5 bzw. 33 %. Dabei konnte die einzelne Variante auf SSC 2 den RHS-Wert von einem Mittelwert von 57,3 (Genotyp C/C, Abbildung 17) auf einen Wert von 25,4 (Genotyp T/T, Abbildung 17) senken. Die einzelne Variante auf SSC 12 konnte den RHS-Wert um 61,5 Punkte von 93,7 (Genotyp G/G, Abbildung 17) auf 32,2 (Genotyp A/A, Abbildung 17) senken und die Variante auf SSC 15 konnte den RHS-Wert von 62,5 (Genotyp T/T, Abbildung 17) auf 8,3 (Genotyp T/T, Abbildung 17) senken. In Kombination erklärten die drei SNPs bis zu 52,8 % der phänotypischen Varianz (Tabelle 14). Der kombinierte Genotyp war zudem signifikant ( $P=1,09e-11$ ) mit dem RHS korreliert.

*Tabelle 15 - Assoziation der verschiedenen Marker mit dem RHS-Wert*

Marker (SSC_Position)	Methode	Wald-chi-		ANOVA p-Wert	erklärte Varianz
		square Test	p-Wert		
Chr2:45022788	Sanger	36,285	1,32E-08	<0.0001	33%
Chr12:14641621	Sanger	18,34	1,34E-03	< 0.001	19,9%
Chr15:128476618	Kasp	14.997	5,54E-04	0.001	18.5%
Kombination		77.78	1,09E-11	<0.0001	52,8%

Bei gleichzeitiger Verwendung aller 3 SNPs (Tabelle 15) bestätigte sich der additive genetische Charakter der Marker. Trotz verbliebener Restvarianz innerhalb der verglichenen Tiergruppen ergab sich ein hochsignifikanter Rückgang des RHS mit steigendem Anteil günstiger Genvarianten aus den 3 SNPs. Schweine mit 6 oder 5 ungünstigen Genvarianten (jeweils homozygote Träger der ungünstigen Varianten an den Markern auf SSC2, 12 und 15) hatten einen durchschnittlichen RHS von 82,9 - 91,7, Schweine mit 6 günstigen Genvarianten hingegen nur einen RHS von 8,3. Insbesondere beim Vorliegen von mindestens 5 aus 6 günstigen Genvarianten zeigte sich eine signifikante Verbesserung des RHS und damit einhergehend auch eine signifikante Verbesserung aller erfassten klinischen, pathologischen und mikrobiologischen Merkmale (Tabelle 16).

Tabelle 16 – Auswirkung der Anzahl positiver Allele auf die verschiedenen bestimmten Merkmale

Merkmal	Positive Allele													
	0	1		2		3		4		5		6		
	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF	MW	SF
Klinik	26,30	-	22,10	10,63	17,39	12,76	19,49	12,18	8,79	11,02	2,86	6,43	1,01	0,81
RoeS	50,00	-	50,00	0,00	35,50	18,82	41,76	14,63	26,20	20,27	9,79	12,51	8,14	8,10
SoS	200,00	-	171,00	50,23	129,50	91,23	168,24	62,98	83,00	90,62	24,79	57,89	11,43	14,91
RHS	91,70	-	82,90	18,45	61,81	39,53	74,46	29,44	39,68	37,48	13,39	23,42	8,31	7,40
Sektion	35,00	-	25,23	4,24	19,59	14,30	28,16	10,06	13,26	14,89	3,49	7,70	1,83	2,11
Vorzeltiger														
Tod	1,00	-	0,75	0,43	0,63	0,48	0,71	0,46	0,27	0,44	0,07	0,26	0,00	0,00
ReisoL	0,90	-	2,65	0,34	1,85	1,13	2,49	0,72	1,53	1,22	0,53	0,89	0,56	0,53

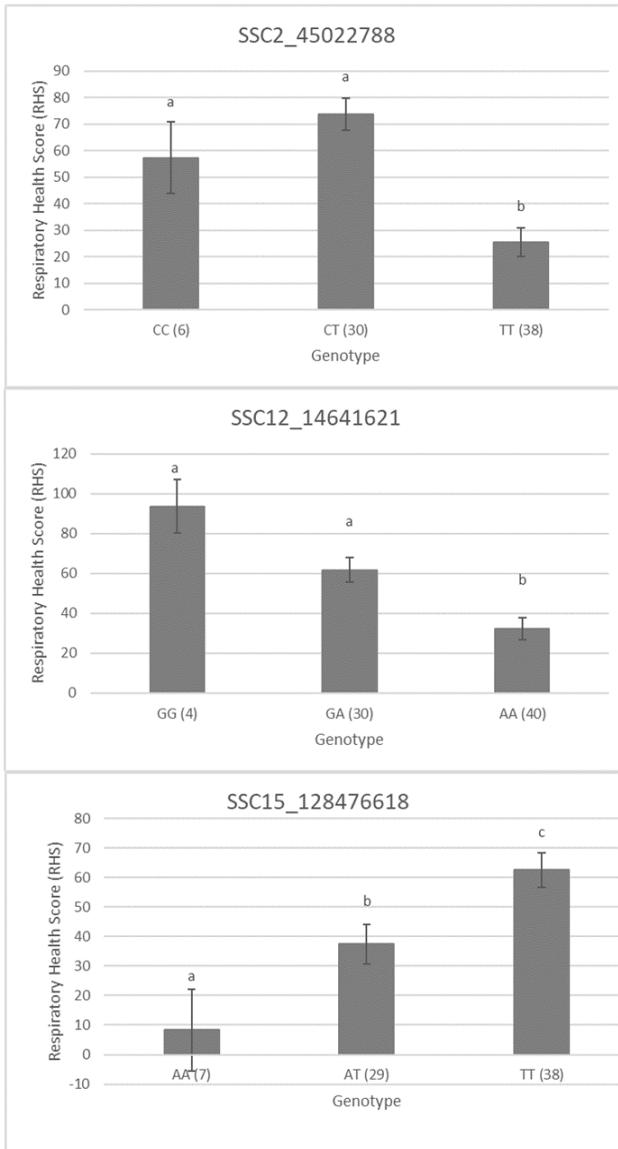


Abbildung 17 - Mittelwerte und Standardabweichung des RHS-Wertes bezogen auf die gefundenen Varianten auf SSC2, SSC 12 und SSC 15 mit den einzelnen Genotypen (Die Zahl in Klammern stellt die Fallzahl dar).

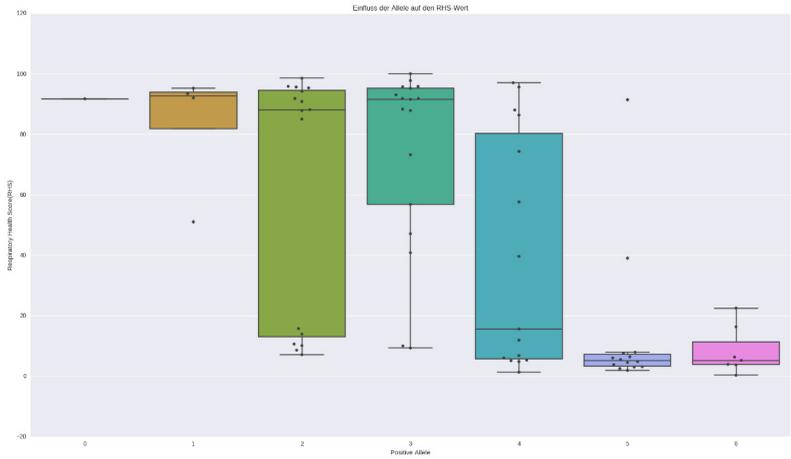


Abbildung 18 - Mittelwerte und Standardabweichung des RHS-Wertes bezogen auf den kombinierten Effekt der positiven Varianten auf SSC 2 (2\_45022788), SSC 12 (14641621) und SSC 15 (15\_128476618).

## 4.5 Kopplungsungleichgewicht

Um Hinweise auf weitere, eventuell nicht-synonyme SNPs im Bereich der bislang näher untersuchten SNPs mit den höchsten Assoziationen zum Phänotyp zu generieren, wurden über das Programm Haploview Kopplungsungleichgewichte bezogen auf die innerhalb des jeweiligen Gens vorhandenen nicht synonymen und somit potenziell kodierenden Varianten und die signifikant mit dem Phänotyp assoziierten Varianten berechnet und grafisch dargestellt (siehe Abbildung 19-21), um Verbindungen mit kodierenden SNPs aufzuzeigen. Die genotypisierten Varianten (Tabelle 14 und 15) waren im Kopplungsungleichgewicht (Abbildung 19-21, rote Blöcke) mit mehreren synonymen SNPs. Im *SPON1*-Gen auf Chromosom 2 konnten wir 4 verschiedene synonyme Varianten im Zusammenhang mit der Variante 2\_45022788 mit einem D'-Wert (Kopplungsungleichgewichtskoeffizient, siehe Material und Methoden) über 0,9 und einem LOD-Score > 2 nachweisen (2\_44976154; 2\_44980598; 2\_44980619 und 2\_44983713). Im *PECAM1 (CD31)*-Gen auf Chromosom 12 waren 2 synonyme Varianten im Kopplungsungleichgewicht mit der Variante 12\_14645074 - mit einem D'-Wert von 1 und einem LOD-Score >2 (12\_14694204; 12\_14695674).

Innerhalb des *Collagen-IV-Gens (COL4A4)* auf Chromosom 15 konnten 2 synonyme SNPs (15\_128567108, 15\_128589706), neun 5'-UTR-Varianten (15\_128549438; 15\_128550342; 15\_128552323; 15\_128552335; 15\_128556890; 15\_128587197; 128595419; 15\_128562624) und sechs Varianten innerhalb einer Splice-Region (15\_128549407; 15\_128512619; 15\_128512617; 15\_128595586 und 15\_128611960) nachgewiesen werden. Alle SNPs hatten einen D'-Wert > 0,9 und einen LOD-Score > 2 mit Bezug auf die SNPs 15\_128476618 und 15\_128600706.

Haploview: *SPON1*-Gen kodierende Varianten (Chr.2)

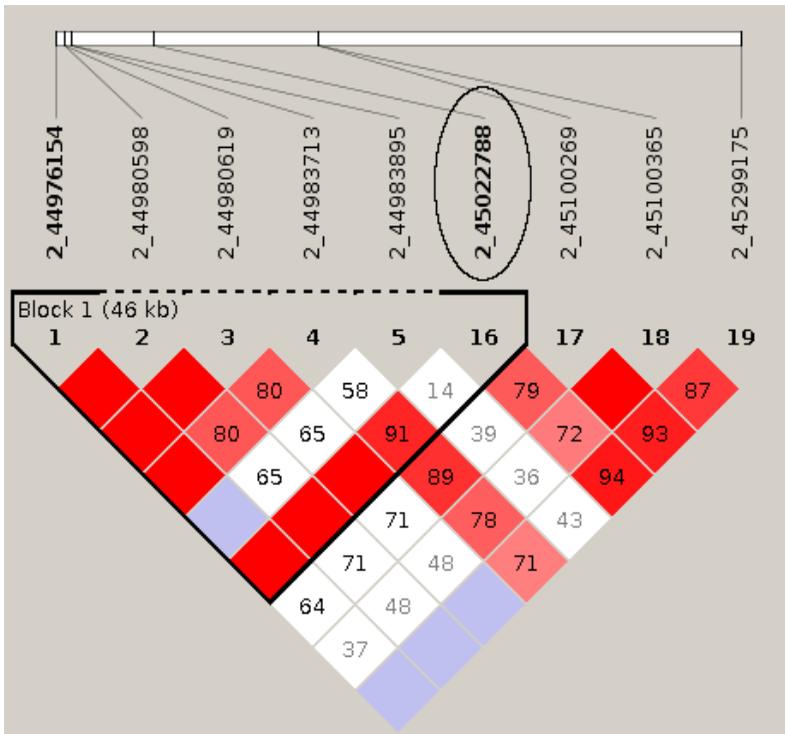


Abbildung 19 - Kopplungsungleichgewicht (LD-Plot) für das *SPON1*(f-Spondin)-Gen

Die markierte Variante (2\_45022788) stellt die signifikant assoziierte Variante auf Chromosom 2 dar.

Die Nummer innerhalb der Boxen zeigt den  $D'$ -Wert (Wert / 100) an.

Rote Kästen ohne eine Nummer zeigen einen  $D'$ -Wert von 1 an und sind im Kopplungsungleichgewicht zueinander.

Haploview: *PECAM1*-Gen kodierende Varianten (Chr.12)

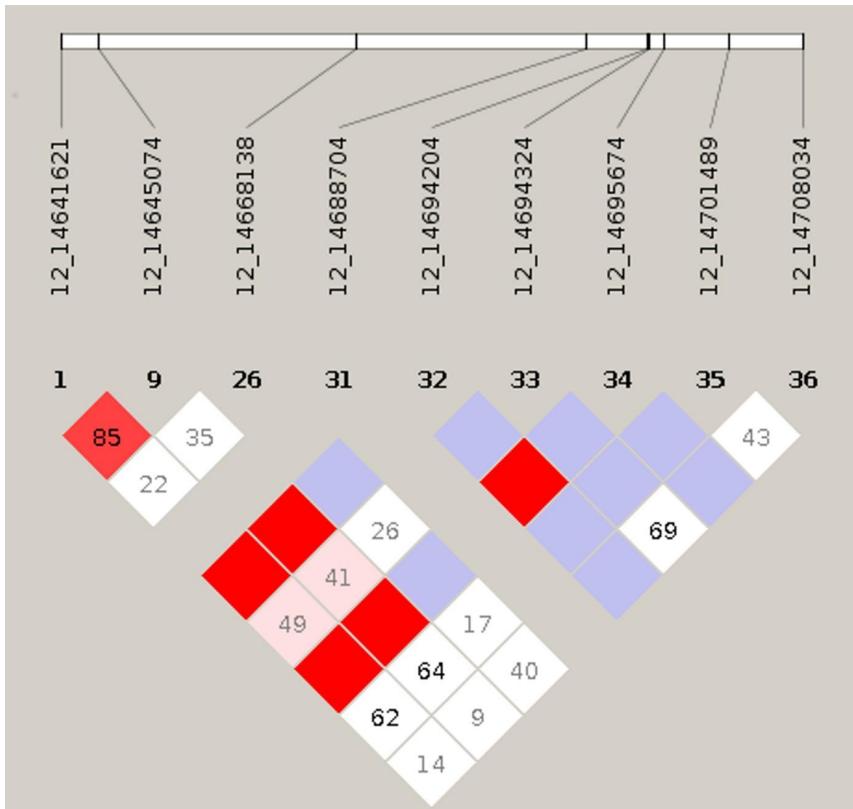


Abbildung 20 - Kopplungsungleichgewicht (LD-Plot) für das *PECAM1*(*CD31*)-Gen

Die Varianten 12\_14645074 12\_14641621 stellen die signifikant assoziierten Varianten auf Chromosom 2 dar. Die Nummer innerhalb der Boxen zeigt den  $D'$ -Wert (Wert / 100) an.

Rote Kästen ohne eine Nummer zeigen einen  $D'$ -Wert von 1 an und sind im Kopplungsungleichgewicht zueinander.

## Haploview: COL4A4-Gen kodierende Varianten(Chr.15)



Abbildung 21 - Kopplungsungleichgewicht (LD-Plot) für das COL4A4-Gen

Die markierte Variante (15\_128476618 und 15\_128600706) stellt die signifikant assoziierte Variante auf Chromosom 2 dar. Die Nummer innerhalb der Boxen zeigt den  $D'$ -Wert (Wert / 100) an. Rote Kästen ohne eine Nummer zeigen einen  $D'$ -Wert von 1 an und sind im Kopplungsungleichgewicht zueinander.

Das Programm Haploview stellt hierfür die Kopplung der verschiedenen Varianten wie bereits beschrieben in verschiedenen Rottönen dar und bildet automatisch potentielle Kopplungsgruppen als Blöcke (Block) ab. Besonders auf SSC 15 (Abbildung 21) wird ein hohes Kopplungsungleichgewicht zwischen den markierten sequenzierten Varianten und anderen nicht-synonymen potentiell kodierenden Varianten deutlich. Auf SSC 2 (Abbildung 19) liegt die sequenzierte Variante innerhalb eines vom Programm errechneten Haplotypen-Blocks, was ebenfalls ein hohes Kopplungsungleichgewicht der darin enthaltenen SNPs aufzeigt. Auch auf SSC 12 wird das hohe Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden sequenzierten Varianten (12\_14641621 und 12\_14645074) deutlich ( $D' = 0,85$ ; Abbildung 20). Diese zeigten ebenfalls Kopplungsungleichgewichte mit zwei anderen Varianten.

#### 4.6 Überprüfung der Marker innerhalb einer kommerziellen Population

Die Marker 2\_45022788, 12\_14645074 (12\_14641621), 15\_128476618 und 15\_128600706 wurden anschließend über die bereits für die Phänotypisierung verwendete Deutsche-Landrasse-Population getestet. Hierfür wurden weitere 125 Tiere infiziert, phänotypisiert und anhand der etablierten Marker über Sanger-Sequenzierung und KASP-Genotypisierung mit den Phänotypen assoziiert. Dabei konnte die Assoziation der Marker auf SSC12 nicht eindeutig bestätigt werden. Der Effekt auf SSC2 und 15 konnte jedoch bestätigt werden (Tabelle 17).

*Tabelle 17 - Modelleffekte der 3 verschiedenen Varianten auf die Resistenz der infizierten Tiere*

SNP	Wald-Chi-Quadrat	Signifikanz (P-Wert)
2_45022788	10,175	0,006
12_14645074	1,129	0,569
15_128476618	7,826	0,020

## 5 Diskussion

### 5.1 Phänotyp

Analog einer Reihe von Studien wurde die hochgradige Empfänglichkeit von Schweinen innerhalb der Deutschen Landrasse bestätigt; 36 der infizierten Schweine verendeten oder mussten bereits vor Tag 7 der Infektion euthanasiert werden (Gregersen et al. 2010; Hoeltig et al. 2009; Reiner et al. 2014a; Reiner et al. 2014b; Sørensen et al. 2011). Andere Schweine zeigten hingegen nur geringe Auswirkungen der Infektion. Der Respiratory Health-Score variierte von Minimalwerten unter 10 bis über 90 (Tabelle 8 und 10, Abbildung 6+7). Diese ausgeprägte Variabilität war auch für die übrigen Phänotypen (Klinik, Sektion, Mikrobiologie) nachweisbar (Tabelle 8 und 10, Abbildungen 22-26 im Anhang). Diese Segregation innerhalb der ausgewählten Schweinepopulation war Grundvoraussetzung für die Durchführung einer genomweiten Assoziationsstudie. Hieraus konnte auch die Eignung des verwendeten Infektionsstammes AP76 (Serotyp 7), der als weniger pathogen gilt als Stämme des Serotyps 2 (Jacobsen et al. 1996; Maas et al. 2006a) und dessen Potential zum Hervorrufen schwerer Pleuritiden bestätigt wurde. Obwohl der Serotyp 7 als weniger pathogen gilt als Serotyp 2, kann dieser jedoch schwerwiegende Probleme innerhalb von Schweinepopulationen verursachen (Gottschalk et al. 2015) und wird somit als virulent beschrieben (Frey 2003). Weiterhin gewährleistet die Infektion mit dem Serotyp 7 eine deutliche Segregation innerhalb verschiedener Schweinepopulationen, wie in den Arbeiten von Reiner et. al (2014a; 2014b) und Hoeltig et al. (2009) beschrieben.

### 5.2 Genetische Resistenz

Bisherige Studien zur Resistenz gegen die Pleuropneumonie basierten auf Genotypisierungen mit geringer Markerdichte in Form von QTL-Studien (Gregersen et al. 2010; Hoeltig et al. 2009; Reiner et al. 2014a; Reiner et al. 2014b; Sørensen et al. 2011). Dabei konnte die Arbeitsgruppe um Gregersen et al. sechs signifikante QTL auf SSC2, 8, 12, 13, 14 und 18 in einer Studie mit 7470 Tieren nachweisen, wobei die Genotypen mit dem Vorhandensein einer dorso-kaudalen chronischen Pleuritis an Schlachtlungen assoziiert wurden. Einige dieser QTL konnten in einer Studie von Reiner et al. (2014a) bestätigt werden. Diese Studie wurde an 170 F2-Kreuzungstieren der Rassen Hampshire und Deutsche Landrasse durchgeführt. Die Founder-Rassen waren zuvor als signifikant unterschiedlich hinsichtlich der Resistenz gegen Pleuropneumonie charakterisiert worden (Hoeltig et al. 2009). Die Kreuzungstiere segregierten deutlich im Hinblick auf ihre Phänotypen. So konnten 7

QTL auf den Chromosomen 2, 6, 12, 13, 16, 17 und 18 nachgewiesen und dabei die von Gregersen et al. (2010) identifizierten Loci bestätigt werden, zumindest was die beteiligten Chromosomen angeht. Die Problematiken der vorhergehenden Studien ergeben sich jedoch aus der stark eingeschränkten Markerdichte, der Verwendung von F2-Kreuzungstieren und den recht niedrigen Tierzahlen. Daher sollte mit dem aktuellen Versuch das Ziel verfolgt werden, eine höhere Genauigkeit der Kartierung von QTL durch Ausbau der Markerdichte und Verkleinerung der Kopplungsgruppen in wenig verwandten Schweinen einer kommerziellen Schweinepopulation (im Gegensatz zu den F2-Tieren) zu erreichen. Hierzu wurde dieselbe DL-Population verwendet wie in der Studie von Reiner et al. (2014a). Während in jener Studie jedoch nur die empfindlichsten DL-Schweine als Founder eingesetzt wurden, konnte für den vorliegenden Versuch die seit der Untersuchung von Hoeltig et al. (2009) bekannte Segregation des Merkmals innerhalb der DL-Population genutzt werden. Aus Gründen des Tierschutzes und aufgrund der Kosten für das Projekt konnte die Tierzahl nicht wesentlich gesteigert werden, doch die hohe Markerdichte, die durch Genotyping-by-Sequencing, d.h. durch genomweite Sequenzierung aller beteiligten Einzeltiere in geringer Abdeckung, erreicht wurde, und die kurzen Kopplungsgruppen einer seit vielen Generationen im Austausch stehenden Population versprachen in Kombination mit der bereits erprobten akkuraten Infektion und Phänotypisierung der Tiere eine Chance darauf, zumindest Gene mit Hauptgencharakter entdecken zu können, sofern diese vorhanden wären. Diese Chance schien Nutzungswürdig, obwohl aufbauend auf den Vorversuchen mit Kandidatengenen zu rechnen war, die einzeln deutlich weniger als 100 % der phänotypischen Varianz erklären würden.

### 5.3 Next-Generation-Sequencing

Zahlreiche Studien belegen, dass von wenigen Ausnahmen abgesehen nicht mit einer monogenen Kausalität von Krankheitsresistenzen zu rechnen ist (Müller et al. 1991; Pooley et al. 2019; Reiner 2009). Dies galt den Vorversuchen entsprechend auch für die Resistenz des Schweins gegen *A. pleuropneumoniae* (Reiner et al. 2014a). Damit musste - unter weitgehendem Ausschluss unsystematischer Umwelteffekte - eine hohe Genauigkeit der Phänotypen erreicht werden, um auch Gene mit geringerer ätiologischer Valenz kartieren zu können. Diese Bedingung war aufgrund der erarbeiteten Methoden zur standardisierten Infektion und exakten und umfangreichen Phänotypisierung, in deren Zentrum der Respiratory Health Score (RHS) stand (Hoeltig et al. 2009), erfüllt. Damit war gleichzeitig die Forderung nach einem aussagekräftigen Zielparame-ter, der den Phänotyp bestmöglich abbildet, erfüllt (Bishop et al. 2014). Aus 163 infizierten Tieren konnten über den Respiratory Health Score die jeweils 37 resistentesten und empfindlichsten Tiere ausgewählt

werden. Die empfindlichen Tiere waren von allen anderen über einen signifikanten und abrupt verlaufenden Anstieg des RHS von 60 auf 90 deutlich abzugrenzen. Tiere mit den niedrigsten RH-Scores unterschieden sich hingegen nur wenig von Tieren mit intermediärem RH-Score. So war es schwierig, eine Grenze ähnlich wie die am Übergang zu den empfindlichen Tieren zu ziehen. Nach der Common-Disease-common-Variant-Hypothese beeinflussen viele häufig in der Population vorkommende Allele die Krankheitsresistenz, wodurch es ohne einen ausreichend abgegrenzten Phänotyp nicht möglich ist, die betreffenden Allele zu identifizieren (Duerr et al. 2006; Sillén et al. 2008). Da also davon ausgegangen werden musste, dass sich die RH-Scores mehr und mehr verschlechtern würden, je mehr Genvarianten einen Beitrag zu dessen Ausprägung zeigen würden (nicht zuletzt aufgrund zunehmender Anteile an Mischerbigen), und die Zielsetzung in erster Linie verfolgte, die wenigen wesentlichsten Kandidatengene zu erarbeiten, wurden nur die extremsten Schweine mit dem stärksten Resistenzgrad als „resistente“ Tiere ausgewählt. Diese 21 Tiere lagen vor einem ersten leichten Sprung der RHS-Werte (siehe Abbildung 7 + 11). Ein zweites Problem war, dass sich aufgrund der hohen Anzahl an eingesetzten Markern (über 17 Millionen) und dem sich daraus ergebenden Problem des multiplen Testens extrem hohe Signifikanzniveaus ergaben (Korrektur der Wahrscheinlichkeitswerte nach Bonferroni und nach der False-Discovery-Rate [FDR; (Benjamini Y 1995; Johnson et al. 2010)]), die auch im günstigsten Falle von Genen mit geringeren erklärten Varianzanteilen nicht mehr erreicht werden können.

Die vorliegende Arbeit konnte die QTL der Arbeitsgruppen Gregersen et al. (2010) und Reiner et al. (2014a) auf den Chromosomen 2 und 12 bestätigen. Dabei war jedoch die Position des von Reiner et al. beschriebenen QTL an einer anderen Position auf SSC 2 als die signifikante Region in der hier vorliegenden Studie. Die zentrale Position des QTL kann auf 145 MB auf SSC 2 geschätzt werden, mit einer relativ kleinen Breite von ca. 6,6 MB. Das Zentrum der signifikanten Region auf SSC 2 in der gegenwärtigen Studie befand sich an der Position 49,5 MB mit einer Breite von 9 MB. Dabei sollte aber erwähnt werden, dass diese Region potentiell mehr als ein Kandidatengen beinhalten könnte und sich über zwei engere Bereiche mit signifikanten SNPs im Bereich um 45 MB und um 54 MB erstreckte. Besonders in der hier aufgeführten Region ist die Annotation in größeren Bereichen teilweise unvollständig, was die Suche nach möglichen Kandidatengenen erschwerte. Einige SNPs der 45-MB-Region überlappten jedoch mit dem *SPON-1*-Gen, welches nicht zuletzt innerhalb der Pathogenese von *A. pleuropneumoniae* als homolog-physiologisches Kandidatengen eine Rolle spielen könnte.

Der QTL auf SSC 12 (Reiner et al. 2014a) zeigte einen Peak zwischen 5 und 63 MB des Chromosoms mit einem Konfidenzintervall von ca. 78 MB. Die signifikant assoziierte Region auf SSC 2 der hier vorliegenden Studie befand sich an der Position 14 MB auf SSC 12 mit einer geringen Breite von 4,7

kB, welche das *PECAM-1*-Gen als homolog-physiologisches Kandidatengen einschließt. Die Studie von Reiner et. al (2014a) konnte allerdings keine Variante auf SSC 15 kartieren. In der hier vorliegenden Studie konnte eine große Anzahl von signifikant assoziierten SNPs um die 128 MB-Region auf SSC 15 über 3,3 MB nachgewiesen werden, wobei speziell Varianten innerhalb der beiden Gene *RHBDD* und *COL4A4* auffällig wurden, die es in weiteren Studien zu betrachten gilt.

SNPs und vorliegende Kopplungsungleichgewichte führten somit zu Genvarianten auf SSC2, 12 und 15, die signifikant mit den Resistenzphänotypen assoziiert waren. Die meisten dieser Varianten lagen in Intron-Bereichen oder zwischen unterschiedlichen Genen (Tabelle 12 und 13). Lediglich die Variante rs339180611 auf SSC15 wurde als eine 3'-UTR-Variante innerhalb der Alpha-Kette des Kollagen-IV identifiziert. Nach einer Kopplungsanalyse zwischen den nicht-kodierenden Intron- und intergenetischen Varianten und allen kodierenden Varianten der betroffenen Gene konnten hohe Kopplungswerte zwischen den genotypisierten Varianten und kodierenden Varianten festgestellt werden (Abbildung 19 - 21). Künftigen Studien bleibt es allerdings vorbehalten, die eigentlich funktionelle Genvariante innerhalb dieser Kopplungsgruppe zu identifizieren.

Varianten auf SSC 16 und 18 innerhalb der groben QTL-Regionen der Vorstudien traten ebenfalls auf. Sie waren jedoch lediglich durch singuläre SNPs vertreten; dieser Befund spricht gegen eine tatsächlich funktionelle Variante in diesem Bereich (Fries, pers. Kommunikation).

#### 5.4 SNPs auf SSC 2

Die assoziierten Varianten auf Chromosom 2 können bis zu 32,9 % der phänotypischen Gesamtvarianz erklären. Dabei fällt eine Tendenz zur Überdominanz in einigen signifikant assoziierten SNPs auf, da der heterozygote Genotyp einen höheren RHS-Wert aufweist als beide homozygoten Genotypen (Tabelle 13). Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre ein sich überdominant verhaltendes Allel analog dem Dr3/Dr4-Risikogenotyp, der im Bereich der humanen Insulinregulation aufgedeckt wurde (Smigoc Schweiger et al. 2016), oder die polare Überdominanz eines SNP zwischen dem *DLK1*-Gen („delta-like homolog“ [*Drosophila*]) und dem *MEG3*-Gen („maternally expressed gene 3“), einem nicht-Protein-kodierenden Gen vom Callipyge-Schaf (Cockett et al. 1996; Schulze-Koops et al. 1992), das eine Hochregulierung der Elterntier-allelspezifischen Gene („parent-of-origin“) verursacht (Bidwell et al. 2014) und somit eine erhöhte Muskelmasse innerhalb von Schafen mit heterozygotem Genotyp zur Folge hat. Andererseits könnte lediglich die Fallzahl, die innerhalb der heterozygoten Gruppe von rs332803837 recht niedrig ausgefallen war, einen solchen Eindruck aufgrund eines weniger zuverlässigen Mittelwertes vermitteln.

Die signifikanten Varianten auf SSC 2 waren hauptsächlich Introns oder intergenetische Varianten, wobei einige innerhalb des oder in unmittelbarer Nähe zum *F-Spondin*-Gen lagen. Das *F-Spondin*- oder *Spondin-1*-Gen wird in der Literatur als extrazelluläres Matrixprotein und Adhäsionsmolekül in Vertebraten beschrieben, das sich in der Embryonalentwicklung an die Grundplatte anheftet und die Axon-Entwicklung steuert (Lee et al. 2016). Weiterhin wurde beschrieben, dass *SPON-1* die Ausschüttung von Zytokinen wie Interleukin-6 als Entzündungsantwort beeinflusst, speziell in Verbindung mit der LPS-Bindung an die glatte Muskulatur von Gefäßen in Mäusen (Lee et al. 2016). Bruun et al. (2012) konnten eine Hochregulation in den Matrixmetalloproteinasen 9 und 12 bezogen auf Lungeninfektionen von Schweinen nachweisen. Matrixmetalloproteinasen wirken in vielen Fällen als erste Barriere gegenüber der Infektion mit gramnegativen Bakterien, wobei das *F-Spondin* an der Ausschüttung der Matrixmetalloproteinase 9 beteiligt sein dürfte (Lee et al. 2016). LPS spielt eine Schlüsselrolle sowohl bei der Pathogenese der Pleuropneumonie als auch für die zelluläre Abwehr im Allgemeinen (Cho et al. 2005) und für die Schädigung von Endothelien und Gefäßen im Lungengewebe. Sie sind somit ein wichtiger Virulenzfaktor von *A. pleuropneumoniae* und als solcher mitverantwortlich für die Ausbildung der typischen Läsionen im Lungengewebe insbesondere im akuten Verlauf (Auger et al. 2009; Chiers et al. 2010) und für das Auftreten plötzlicher Todesfälle im perakuten Verlauf (Gottschalk 2012). Somit könnte eine Variante innerhalb des kodierenden Bereiches des *Spondin-1*-Gens protektive Auswirkungen auf die LPS-Abwehr-Achse im Rahmen einer *A. pleuropneumoniae*-Infektion nehmen. In der vorliegenden Studie konnten zwar nur Intron-Varianten entdeckt werden. Diese waren jedoch mit der Ausprägung des Phänotyps signifikant assoziiert. Sowohl Intron-Varianten als auch synonyme Varianten können jedoch Effekte auf das mRNA-Splicing, die mRNA-Stabilität, die mRNA-Struktur und das Falten der Proteine haben (Hunt et al. 2009; Wang et al. 2015). Weitere Studien sind notwendig, um die tatsächliche Funktion und die funktionelle Genvariante zu erarbeiten.

## 5.5 SNPs auf SSC 12

Auch bei dem Polymorphismus auf SSC12 (Tabelle 11,12,13) handelt es sich um eine Intron-Variante. Sie liegt im *PECAM1* („*platelet and endothelial cell adhesion molecule 1*“)-Gen und kann bis zu 19,9 % der phänotypischen Varianz erklären. Das Gen gehört zu der Familie der *ITBIM* („*ig-immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*“), welche die hämatopoetischen Zellfunktionen, die Leukozyten-Transmigration, das Gleichgewicht des Immunsystems, die Blutgerinnung über Thrombozyten, die Unterdrückung von Apoptosemechanismen und die vaskuläre Durchlässigkeit steuern (Liao et al. 1997; Newton et al. 1997; Sun et al. 1996; Xie et al. 1993). In einer Studie von

Maas et al. (2005) wurden Mäuse mit einem ausgeknockten *PECAM1*- Gen mit Lipopolysacchariden behandelt. Dabei waren die Mäuse ohne funktionierenden CD31-Rezeptor empfänglicher für die Auswirkungen von LPS als die Kontrollgruppe. Lovelace et al. (2013) konnten hingegen zeigen, dass Mäuse, denen der CD31- Rezeptor fehlt, resistenter gegenüber einer Infektion mit *Salmonella typhimurium* sind als Wildtyp-Mäuse mit intaktem *PECAM1*-Gen. Sie konnten die Funktion von *PECAM1* mit seinem hohen Gehalt an Mannoseresten und N-Acetylglucosaminen als Adhäsionsrezeptor für *Salmonella typhimurium* belegen. *PECAM1* erscheint also als ein möglicher Adhäsionsfaktor für gramnegative Bakterien über die in der äußeren Zellmembran enthaltenen LPS, die für *A. pleuropneumoniae* ebenfalls einen wichtigen Faktor - nicht zuletzt bei der Adhäsion - darstellen könnten (Bossé et al. 2002a).

## 5.6 SNPs auf SSC 15

Die SNPs auf SSC15 liegen innerhalb einer Region mit den Genen der Alpha-3- und Alpha-4-Kette des Kollagen-IV (*COL4A3*, *COL4A4*). Die Varianten erklärten bis zu 18,5 % der phänotypischen Varianz.

Über 60 Prozent des Bindegewebes im Parenchym der humanen Lunge besteht aus Kollagen (van Kuppevelt et al. 1995). Dieses spielt bei der Anheftung von pathogenen und kommensalen Bakterien über spezifische Adhäsine an das Kollagen eine herausragende Rolle.

Kommensalen wie das *Bifidobakterium adolensis* binden mit Zelloberflächenproteinen an Kollagen-I und-IV (Mukai et al. 1997). Weiterhin konnten Fimbrien-Adhäsine von Klebsiellen für die Bindung an Kollagen und ein Kollagen-Rezeptor auf *Staphylococcus-aureus*-Stämmen nachgewiesen werden, die aus Patienten mit septischer Arthritis isoliert wurden (Sebghati et al. 1998; Switalski et al. 1993). In einer Studie von Schulze-Koops et al. (1992) wurde das YadA-Membranprotein von *Yersinia* als Mediator für die Bindung an verschiedene Kollagentypen identifiziert. Ein dem YadA ähnliches Membranprotein wurde auch aus *A. pleuropneumoniae* isoliert. Es könnte eine ähnliche Funktion haben und sich damit ebenfalls an der Adhäsion beteiligen (Chung et al. 2007). In Studien von Enriquez-Verdugo et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass *A. pleuropneumoniae* an Kollagen-I, -II, -III und -IV über ein 60kDa großes Membranprotein binden kann.

Sowohl die Intron-Variante als auch der Polymorphismus im 3'-UTR-Bereich des Kollagen-IV-Gens zeigen eine Kopplung zu Varianten in Splice-Regionen und 5'-UTR-Varianten, die in der Lage sind, über eine Veränderung der Splice-Bereiche eine Veränderung der mRNA und somit eine Veränderung

des Transkripts zu erreichen. Es scheint, dass sich ein Großteil der Mutationen, die für die Ausbildung einer Erkrankung verantwortlich sind, durch verändertes Splicen indirekt auf das Transkript auswirkt (Lim et al. 2011; López-Bigas et al. 2005). In Verbindung mit 3'-UTR-Varianten sind genetische Resistenzen gegen Bovine Tuberkulose und *Brucella abortus* beim Rind innerhalb des *SLC11A1*-Gens beschrieben (Borriello et al. 2006; Capparelli et al. 2007; Kadarmideen et al. 2011; Martínez et al. 2010). Es ist also sowohl 3'-UTR-Varianten als auch 5'-UTR-Varianten möglich, den Transkriptionsprozess über strukturelle und funktionelle Veränderung der mRNA sowie der miRNA-Bindungsstellen zu beeinträchtigen (Chatterjee et al. 2009).

Die entdeckten Varianten auf SSC 15 könnten somit Teil eines molekularen Mechanismus sein, der die Fähigkeit von *A. pleuropneumoniae* vermindert, sich an extrazelluläre Matrixmetalloproteine anzuheften und seine pathogene Wirkung zu entfalten. Gene, die an der Bildung von Kollagen-Strukturen beteiligt sind, könnten somit einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschungsarbeiten darstellen, insbesondere bezogen auf die Pathogenese und Resistenz gegenüber *A. pleuropneumoniae*.

## 5.7 Nutzung der SNPs als Marker

Besonders in Zusammenhang mit den Varianten auf SSC2, 12 und 15 (rs332803837 [Chr.2:45022788], Chr.12:14645074 und rs339180611 [Chr.15:128476618]), denen potentielle Auswirkungen auf die Adhäsion und/oder den direkten Eingriff in die LPS-Antwort unterstellt werden, ist künftig ein Einsatz in der genomischen Selektion von Zuchtschweinen auf Resistenz gegen Pleuropneumonie denkbar. Derzeit werden die Marker im Feld auf die entsprechende Eignung hin überprüft. Die neuen Selektionschips wurden um die drei genannten Marker erweitert; dennoch ist klar, dass die resultierende Gesamtresistenz von Schweinen gegen Pleuropneumonie von weiteren Genen und deren Varianten mitbeeinflusst wird, die wir heute noch nicht kennen. Somit sind auch bei Tieren, die an den drei ausgewählten Genorten mehrheitlich günstige Genvarianten aufweisen, grundsätzlich höhere Empfindlichkeiten als erwartet möglich. Insbesondere bei Tieren im intermediären Resistenzbereich wäre eine exakte Einschätzung der Resistenzlage nicht möglich, weil etliche der 27 möglichen Genkombinationen aufgrund der begrenzten Tierzahl nicht realisiert wurden. 16 Genotypen traten mit weniger als 3 Tieren auf, 9 Genotypen kamen überhaupt nicht vor. Auf diese Weise kann auch erklärt werden, warum andere Gene, deren Existenz erwartet werden muss, nicht entdeckt wurden. Um die Zahl der Extremtiere zu steigern, hätten jedoch überdimensional viele Schweine infiziert und untersucht werden müssen. Solche Tierzahlen mussten aufgrund von finanziellen und Tierschutzüberlegungen ausgeschlossen werden.

In die jetzt anstehenden Überprüfungen der Marker sollten auch andere Rassen einbezogen werden. Es ist denkbar, dass andere Rassen oder Populationen ihren Resistenzgrad zumindest teilweise über andere Mechanismen und Pathways realisieren. Diese Vermutung war auch ein Grund dafür, sich zunächst auf eine Rasse zu beschränken, um die Chance darauf zu wahren, überhaupt erste Gene mit Assoziation zur Resistenz gegen Pleuropneumonie zu identifizieren. Zukünftige Studien sollten mit höherer Abdeckung arbeiten, um den zufälligen Informationsverlust wichtiger Genvarianten bei genotypisierten Einzeltieren zu minimieren und deren Entdeckung weniger dem Zufall zu überlassen. Durch neue Methoden wie das „targeted sequencing“ (Dilliot et al. 2018) könnten die Ergebnisse der drei Marker an einer größeren Tierzahl validiert werden. Auch Expressionsstudien könnten zukünftig mithelfen, die Wirkung der Genvarianten über die beteiligten Pathways abzusichern.

## 5.8 Fazit

In der hier vorliegenden Arbeit konnten potentielle Genmarker bestimmt werden, die signifikant mit der Resistenz gegen das Bakterium *Actinobacillus pleuropneumoniae* assoziiert waren und einen signifikanten Einfluss auf alle erhobenen Parameter hatten.

Allerdings konnten lediglich Intron-Varianten und Varianten innerhalb der nicht translatierten Bereiche (UTR) des Gens erfasst werden, deren potentielle Funktion bis jetzt nicht ausreichend geklärt ist (Chatterjee et al. 2009) und deren Effekte somit durch eine Kopplung mit den eigentlichen kodierenden Varianten vermittelt werden könnten. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass weitere Varianten, die eventuell existieren und innerhalb des kodierenden Bereiches der Gene liegen, nicht gefunden wurden – z.B. aufgrund des gewählten Ansatzes der geringen Abdeckung (Bizon et al. 2014), einer geringen Tieranzahl und des nicht ausreichend annotierten Referenzgenoms. Die durch die NGS erstellten Polymorphismen stimmten weitgehend mit den über Sanger-Sequenzierung und KASP-Genotypisierung validierten Varianten überein, es gab dennoch einige Inkongruenzen, die im Zusammenhang mit anderen Polymorphismen für eine mögliche Resistenz und andere Pathogenitätsmechanismen von *A. pleuropneumoniae* verantwortlich sein könnten. Fehler und Lücken innerhalb des aktuellen Genoms (Mai 2017, Sus Scrofa 11.1) (Warr et al. 2019) könnten ebenfalls der Entdeckung weiterer wichtiger Varianten innerhalb der Resistenzentwicklung entgegenstehen. Es existieren noch immer Lücken und schlecht abgedeckte Bereiche, die es uns nicht erlauben einige Polymorphismen identifizieren zu können, wie es im alten Referenzgenom der Fall war (Sus Scrofa 10.2) (Warr et al. 2015; Warr et al. 2019). Sogar das wohl am besten und ausführlichsten annotierte und erforschte humane Referenzgenom enthält noch immer Lücken und problematische Bereiche, die es zu verbessern gilt (Jain et al. 2018).

Bezogen auf den von uns gewählten Ansatz der geringen Sequenzierentiefe ergaben sich ebenfalls Probleme durch die gewählte Referenzpopulation, die wiedererwartend weniger mit der von uns gewählten Referenzpopulation übereingestimmt hat als erwartet. Innerhalb einer Prinzipalkomponentenanalyse und beim anschließende Auftragen der ersten und zweiten Prinzipalkomponente gegeneinander zeigte sich zwischen unseren PL-Deutsche-Landrassen-Tieren und den DL-Deutsche-Landrassen-Tieren der Referenzpopulation ein erkennbarer Unterschied (siehe Anhang Abbildung 40).

Dennoch konnte gezeigt werden, dass mit den in dieser Arbeit etablierten SNP-Markern die Resistenz von Deutsche-Landrasse-Schweinen gegen die porcine Pleuropneumonie erhöht werden kann. Dabei ist bereits bei einer partiellen Resistenz von erheblichen positiven Auswirkungen auf die weltweite Schweineproduktion auszugehen. Die Anwendung von partiell resistenten Schweinen kann zu einem geringeren Infektionsdruck und nachfolgend zu geringeren Kosten und verbessertem Tierschutz

führen (Reiner 2009). Nicht zuletzt könnten genetische Resistenzen bezüglich der immer gravierender erscheinenden Lage der Antibiotikaresistenzen ein Teil der Lösung für eine tierschutzgerechte Produktion von Schweinen ohne vermehrten Antibiotikaeinsatz darstellen. Dabei ist eine mögliche Wechselwirkung der Marker mit anderen Krankheitserregern nicht auszuschließen und sollte vor dem Einsatz ausführlich überprüft werden.

Nachfolgende Studien sollten somit über eine erhöhte Abdeckung und eine Fokussierung auf die bereits etablierten Kandidatengene und Chromosomen die Austestung der Marker in verschiedenen kommerziellen Populationen zum Ziel haben. Weiterhin muss die genetische Basis, die sich hinter den Markern und potentiellen Resistenzen verbirgt, beleuchtet werden. Die in dieser Arbeit angestellten Vermutungen bezogen auf die möglichen genetischen Auswirkungen müssen durch weitere Studien validiert werden. Durch eine gezielte Expressionsstudie könnten weitere Hinweise auf beteiligte und neue Gene aufgezeigt werden, die den nicht durch unsere Marker erklärten Rest der phänotypischen Varianz erklären können.

## 6 Zusammenfassung

Das Bakterium *Actinobacillus pleuropneumoniae* ist bekannt als eines der wichtigsten respiratorischen Pathogene in der kommerziellen Schweineproduktion. Durch die Erkrankung kommt es zu hohen wirtschaftlichen Verlusten aufgrund von akuter oder chronischer Pleuropneumonie, die in eine verminderte Performance und gesteigerte Mortalität mündet.

Eine antibiotische Therapie und Impfungen gewährleisten lediglich begrenzten Schutz gegen die Auswirkungen der Erkrankung, wobei die vermehrte Anwendung von Antibiotika besonders im Nutztierbereich nicht mehr zu rechtfertigen ist.

Genetisch determinierte Krankheitsresistenz bildet in diesem Zusammenhang eine potentielle Alternative, um den Verbrauch an Antibiotika zu senken, ohne den Tierschutz und das Wohlbefinden der betroffenen Tiere zu gefährden.

In vorangegangenen Studien konnten mehrere QTL über kontrollierte Infektionsstudien innerhalb einer Kreuzungsrasse zwischen Hampshire- und Deutsche-Landrasse-Tieren entdeckt werden, die bis zu 30 % der phänotypischen Varianz erklären konnten.

Aufbauend auf diese Studie war das Ziel dieser Arbeit, die für die Resistenz gegen die porcine Pleuropneumonie verantwortlichen Marker (QTN) zu finden. Es wurden dabei 163 Schweine aus einer für *A. pleuropneumoniae* unterschiedlich empfänglichen Deutsche-Landrasse-Population mit dem *A. pleuropneumoniae*-Serotyp-7 über eine standardisierte Aerosol-Vernebelung infiziert.

Phänotypen wurden daraufhin exakt auf klinischer, pathologischer und mikrobiologischer Basis definiert. Anschließend wurden jeweils 37 der am meisten und am wenigsten betroffenen Tiere über Next-Generation-Sequencing genotypisiert und Assoziationen zwischen Genotyp und Phänotyp über eine genomweite Assoziationsstudie erstellt.

Die genomweite Assoziationsstudie konnte Polymorphismen innerhalb der Deutsche-Landrasse-Population identifizieren, die auf den Chromosomen 2, 12 und 15 genomweite Signifikanz zum Phänotyp gezeigt haben. Die Varianten konnten einzeln von 18,5 % bis zu 32,9% der Varianz erklären. In Kombination war es den Polymorphismen möglich, 52,8 % der Varianz zu erklären - bei einem P-Wert von  $1,09e10^{-11}$ . Dabei waren die betroffenen Gene in die Pathogenese der Infektion mit *A. pleuropneumoniae* involviert.

Mit der hier vorliegenden Arbeit konnten wir die polygenetische Basis der Resistenz gegen Pleuropneumonie aufzeigen. Dabei kommen positive Genvarianten innerhalb von kommerziellen

Schweinepopulationen vor, und es ist möglich, diese durch eine gezielte Züchtung in Schweinepopulationen einzubringen. Dennoch müssen Folgestudien die Allelfrequenz innerhalb anderer Populationen nachvollziehen und den genetischen Hintergrund weiter beleuchten.

## 7 Summary

The bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* is one of the most important respiratory pathogens in commercial pig production. Infection with the pathogen results in high economic losses due to acute and chronic pleuropneumonia and therefore decreased performance and an increased mortality.

Antibiotic therapy and vaccination only result in limited protection against the recuperation from the disease. Especially in livestock species, the increased usage of antibiotics is not feasible anymore.

Therefore, genetically determined disease resistance could be part of an alternative path to decreased antibiotic usage in combination with increased animal welfare and consumer acceptance.

Previous studies could discover multiple QTL through controlled infection experiments with a crossbred Hampshire/Landrace population that could explain up to 30 % of the phenotypic variance. In this context, the aim of this study was to discover the genetic variants (markers) directly responsible for disease resistance against porcine pleuropneumonia (QTN).

163 pig from a German Landrace breed, known for its diverse susceptibility to pleuropneumonia, were used in a controlled aerosol infection experiment with *A. pleuropneumonia* serotype 7 (AP76). Resulting phenotypes were defined on clinical, pathological and microbiological basis.

Thirty-seven of the most and least resistant animals, respectively, were genotyped through next generation sequencing. The associations between genotype and phenotype were calculated through a genome-wide association study (GWAS).

Genome-wide association study revealed polymorphisms in the Landrace population on chromosomes 2, 12 and 15 of genome-wide significance with relation to the phenotype. They could each explain between 18.5 % and 32.9 % of the phenotypic variance. Combined variants could explain up to 52.8 %, with a p-value of  $1.09e10^{-11}$ , and the affected genes were highly involved in the pathomechanism of the infection with *A. pleuropneumoniae*.

Therefore, this study could show the polygenetic background of the disease resistance against pleuropneumonia in swine. Genetic variants with a positive impact on resistance of swine against *A. pleuropneumoniae* are part of commercial populations, and it is possible to breed for disease resistance. Nevertheless, follow up studies for the calculation of allele frequencies in other swine populations and further illumination of the genetic background of the disease resistance against pleuropneumonia in swine is necessary to establish resilient quantitative trait nucleotides usable in the swine industry.

## 8 Literaturverzeichnis

Abo-Ismaïl MK, Brito LF, Miller SP, Sargolzaei M, Grossi DA, Moore SS, Plastow G, Stothard P, Nayeri S, Schenkel FS (2017): Genome-wide association studies and genomic prediction of breeding values for calving performance and body conformation traits in Holstein cattle. *Genetics, selection, evolution : GSE* 49 (1), S. 82. DOI: 10.1186/s12711-017-0356-8.

Afonso CL, Neilan JG, Kutish GF, Rock DL (1996): An African swine fever virus Bc1-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *Journal of virology* 70 (7), S. 4858–4863.

Ait-Ali T, Wilson AD, Westcott DG, Clapperton M, Waterfall M, Mellencamp MA, Drew TW, Bishop SC, Archibald AL (2007): Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages. *Viral immunology* 20 (1), S. 105–118. DOI: 10.1089/vim.2006.0078.

Appleyard GD, Furesz SE, Wilkie BN (2002): Blood lymphocyte subsets in pigs vaccinated and challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86 (3-4), S. 221–228.

Archambault M, Rioux S, Jacques M (1999): Evaluation of the hemoglobin-binding activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* using fluorescein-labeled pig hemoglobin and flow cytometry. *FEMS microbiology letters* 173 (1), S. 17–25. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13479.x.

Auger E, Deslandes V, Ramjeet M, Contreras I, Nash JH E, Harel J, Gottschalk M, Olivier M, Jacques M (2009): Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infection and immunity* 77 (4), S. 1426–1441. DOI: 10.1128/IAI.00297-08.

Baltes N, Buettner FF R, Gerlach G-F (2007): Selective capture of transcribed sequences (SCOTS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the chronic stage of disease reveals an HlyX-regulated autotransporter protein. *Veterinary Microbiology* 123 (1-3), S. 110–121. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.03.026.

Baltes N, Gerlach GF (2004): Identification of genes transcribed by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in necrotic porcine lung tissue by using selective capture of transcribed sequences. *Infection and immunity* 72 (11), S. 6711–6716. DOI: 10.1128/IAI.72.11.6711-6716.2004.

Baltes N, Tonpitak W, Gerlach GF, Hennig-Pauka I, Hoffmann-Moujahid A, Ganter M, Rothkötter HJ (2001): *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity. Effects on bacterial virulence and host immune response. *Infect. Immun.* 69 (1), S. 472–478. DOI: 10.1128/IAI.69.1.472-478.2001.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005): Haploview. Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21 (2), S. 263–265. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth457.

Beck M, van den Bosch JF, Jongenelen IM, Loeffen PL, Nielsen R, Nicolet J, Frey J (1994): RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *Journal of clinical microbiology* 32 (11), S. 2749–2754.

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

Bélanger M, Dubreuil D, Harel J, Girard C, Jacques M (1990): Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* 58 (11), S. 3523–3530.

Bélanger M, Dubreuil D, Jacques M (1994): Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 62 (3), S. 868–873.

Benga L, Hoeltig D, Rehm T, Rothkoetter H-J, Pabst R, Valentin-Weigand P (2009): Expression levels of immune markers in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs and their relation to breed and clinical symptoms. *BMC veterinary research* 5, S. 13. DOI: 10.1186/1746-6148-5-13.

Benjamini Y HY (1995): Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B* (57), S. 289–300.

Bermingham ML, Bishop SC, Woolliams JA, Pong-Wong R, Allen AR, McBride SH, Ryder JJ, Wright DM, Skuce RA, McDowell SW, Glass EJ (2014): Genome-wide association study identifies novel loci associated with resistance to bovine tuberculosis. *Heredity* 112 (5), S. 543–551. DOI: 10.1038/hdy.2013.137;

Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, Juanchich A, Bernard M, Noël B, Bento P, Da Silva C, Labadie K, Alberti A, Aury J-M, Louis A, Dehais P, Bardou P, Montfort J, Klopp C, Cabau C, Gaspin C, Thorgaard GH, Bousaha M, Quillet E, Guyomard R, Galiana D, Bobe J, Volff J-N, Genêt C, Wincker P, Jaillon O, Roest Crollius H, Guiguen Y (2014): The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature communications* 5, S. 3657. DOI: 10.1038/ncomms4657.

Bertschinger HU, Stamm M, Vögeli P (1993): Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: Experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107. *Veterinary Microbiology* 35 (1-2), S. 79–89. DOI: 10.1016/0378-1135(93)90117-P.

Bidwell CA, Waddell JN, Taxis TM, Yu H, Tellam RL, Neary MK, Cockett NE (2014): New insights into polar overdominance in callipyge sheep. *Animal genetics* 45 Suppl 1, S. 51–61. DOI: 10.1111/age.12132.

Bishop, S. C. (2010): Breeding for disease resistance in farm animals. 3. ed. Wallingford: CABI. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1079/9781845935559.0000>.

Bishop SC, Woolliams JA (2014): Genomics and disease resistance studies in livestock☆. *Livestock Science* 166, S. 190–198. DOI: 10.1016/j.livsci.2014.04.034.

Bisset SA, Morris CA (1996): Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode challenge. *International journal for parasitology* 26 (8-9), S. 857–868.

Bizon C, Spiegel M, Chasse SA, Gizer IR, Li Y, Malc EP, Mieczkowski PA, Sailsbery JK, Wang X, Ehlers CL, Wilhelmson KC (2014): Variant calling in low-coverage whole genome sequencing of a Native American population sample. *BMC genomics* 15, S. 85. DOI: 10.1186/1471-2164-15-85.

Boddicker N, Waide EH, Rowland RR R, Lunney JK, Garrick DJ, Reecy JM, Dekkers JC M (2012): Evidence for a major QTL associated with host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge. *Journal of animal science* 90 (6), S. 1733–1746. DOI: 10.2527/jas.2011-4464.

Boddicker NJ, Bjorkquist A, Rowland RR R, Lunney JK, Reecy JM, Dekkers JC M (2014a): Genome-wide association and genomic prediction for host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Genetics, selection, evolution : GSE* 46, S. 18. DOI: 10.1186/1297-9686-46-18.

Boddicker NJ, Garrick DJ, Rowland RR R, Lunney JK, Reecy JM, Dekkers JC M (2014b): Validation and further characterization of a major quantitative trait locus associated with host response to experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Animal genetics* 45 (1), S. 48–58. DOI: 10.1111/age.12079.

- Boekema BK H L, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE, Kamp EM, van Putten JP, Verheijden JH (2003): Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 93 (2), S. 133–144.
- Boekema BK H L, van Putten JP M, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE (2004): Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 72 (2), S. 691–700.
- Borca MV, Carrillo C, Zsak L, Laegreid WW, Kutish GF, Neilan JG, Burrage TG, Rock DL (1998): Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *Journal of virology* 72 (4), S. 2881–2889.
- Borriello G, Capparelli R, Bianco M, Fenizia D, Alfano F, Capuano F, Ercolini D, Parisi A, Roperto S, Iannelli D (2006): Genetic resistance to *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect. Immun.* 74 (4), S. 2115–2120. DOI: 10.1128/IAI.74.4.2115-2120.2006.
- Bossé JT, Gilmour HD, MacInnes JI (2001): Novel genes affecting urease activity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of bacteriology* 183 (4), S. 1242–1247. DOI: 10.1128/JB.183.4.1242-1247.2001.
- Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR (2002a): *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection* 4 (2), S. 225–235.
- Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Simon Kroll J, Langford PR (2002b): *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection* 4 (2), S. 225–235. DOI: 10.1016/S1286-4579(01)01534-9.
- Bossé JT, Johnson RP, Nemeč M, Rosendal S (1992): Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* 60 (2), S. 479–484.
- Bossé JT, Li Y, Atherton TG, Walker S, Williamson SM, Rogers J, Chaudhuri RR, Weinert LA, Holden MT G, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR (2015a): Characterisation of a mobilisable plasmid conferring florfenicol and chloramphenicol resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 178 (3-4), S. 279–282. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.05.020.
- Bossé JT, Li Y, Fernandez Crespo R, Lacouture S, Gottschalk M, Sárközi R, Fodor L, Casas Amoribieta M, Angen Ø, Nedbalcova K, Holden MT G, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR (2018): Comparative sequence analysis of the capsular polysaccharide loci of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1-18, and development of two multiplex PCRs for comprehensive capsule typing. *Veterinary Microbiology* 220, S. 83–89. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.05.011.
- Bossé JT, Li Y, Rogers J, Fernandez Crespo R, Li Y, Chaudhuri RR, Holden MT G, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR (2017a): Whole Genome Sequencing for Surveillance of Antimicrobial Resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Frontiers in microbiology* 8, S. 311. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00311.
- Bossé JT, Li Y, Sárközi R, Gottschalk M, Angen Ø, Nedbalcova K, Rycroft AN, Fodor L, Langford PR (2017b): A Unique Capsule Locus in the Newly Designated *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serovar 16 and Development of a Diagnostic PCR Assay. *Journal of clinical microbiology* 55 (3), S. 902–907. DOI: 10.1128/JCM.02166-16.
- Bossé JT, Li Y, Walker S, Atherton T, Fernandez Crespo R, Williamson SM, Rogers J, Chaudhuri RR, Weinert LA, Oshota O, Holden MT G, Maskell DJ, Tucker AW, Wren BW, Rycroft AN, Langford PR

- (2015b): Identification of dfrA14 in two distinct plasmids conferring trimethoprim resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 70 (8), S. 2217–2222. DOI: 10.1093/jac/dkv121.
- Bossé JT, MacInnes JI (2000): Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 64 (3), S. 145–150.
- Broes A, Martineau GP, Gottschalk M (2007): Dealing with unexpected *Actinobacillus pleuropneumoniae* serological results. *J Swine Health Prod.* (15(5)), S. 264–269.
- Brouard J-S, Boyle B, Ibeagha-Awemu EM, Bissonnette N (2017): Low-depth genotyping-by-sequencing (GBS) in a bovine population. Strategies to maximize the selection of high quality genotypes and the accuracy of imputation. *BMC genetics* 18 (1), S. 32. DOI: 10.1186/s12863-017-0501-y.
- Browning BL, Browning SR (2016): Genotype Imputation with Millions of Reference Samples. *American journal of human genetics* 98 (1), S. 116–126. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.11.020.
- Browning SR, Browning BL (2007): Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. *American journal of human genetics* 81 (5), S. 1084–1097. DOI: 10.1086/521987.
- Bruun CS, Leifsson PS, Johansen LK, Jensen HE, Nielsen J, Fredholm M (2012): Expression of matrix metalloproteinase-9 and -12 in porcine lung infections. *Journal of comparative pathology* 146 (2-3), S. 253–257. DOI: 10.1016/j.jcpa.2011.05.005.
- Buettner FF, Konze SA, Maas A, Gerlach GF (2011): Proteomic and immunoproteomic characterization of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Proteome science* 9 (1), S. 23. DOI: 10.1186/1477-5956-9-23.
- Buettner FF R, Maas A, Gerlach G-F (2008): An *Actinobacillus pleuropneumoniae* arcA deletion mutant is attenuated and deficient in biofilm formation. *Veterinary Microbiology* 127 (1-2), S. 106–115. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.08.005.
- Burkey TE, Skjolaas KA, Dritz SS, Minton JE (2007): Expression of Toll-like receptors, interleukin 8, macrophage migration inhibitory factor, and osteopontin in tissues from pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium or serovar Choleraesuis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115 (3-4), S. 309–319. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.11.012.
- C. A. L. Oura, P. P. Powell, E. Andersonãand, R. M. E. Parkhouse (1998): The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *Journal of General Virology* (79), S. 1439–1443.
- Cai Y, Postnikova EN, Bernbaum JG, Yú SQ, Mazur S, Deiuliis NM, Radoshitzky SR, Lackemeyer MG, McCluskey A, Robinson PJ, Haucke V, Wahl-Jensen V, Bailey AL, Lauck M, Friedrich TC, O'Connor DH, Goldberg TL, Jahrling PB, Kuhn JH (2015): Simian hemorrhagic fever virus cell entry is dependent on CD163 and uses a clathrin-mediated endocytosis-like pathway. *Journal of virology* 89 (1), S. 844–856. DOI: 10.1128/JVI.02697-14.
- Calvert JG, Slade DE, Shields SL, Jolie R, Mannan RM, Ankenbauer RG, Welch S-KW (2007): CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Virol.* (81), S. 7371–7379.
- Capparelli R, Alfano F, Amoroso MG, Borriello G, Fenizia D, Bianco A, Roperto S, Roperto F, Iannelli D (2007): Protective effect of the Nramp1 BB genotype against *Brucella abortus* in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Infect. Immun.* 75 (2), S. 988–996. DOI: 10.1128/IAI.00948-06.

- Chatterjee S, Pal JK (2009): Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the cell* 101 (5), S. 251–262. DOI: 10.1042/BC20080104.
- Chien M-S, Chan Y-Y, Chen Z-W, Wu C-M, Liao J-W, Chen T-H, Lee W-C, Yeh K-S, Hsuan S-L (2009): Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* 135 (3-4), S. 327–333. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.09.071.
- Chiers K, Donné E, van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F (2002): Actinobacillus pleuropneumoniae infections in closed swine herds. Infection patterns and serological profiles. *Veterinary Microbiology* 85 (4), S. 343–352. DOI: 10.1016/S0378-1135(01)00518-1.
- Chiers K, Waele T de, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F (2010): Virulence factors of Actinobacillus pleuropneumoniae involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Veterinary research* 41 (5), S. 65. DOI: 10.1051/vetres/2010037.
- Chin N, Frey J, Chang CF, Chang YF (1996): Identification of a locus involved in the utilization of iron by Actinobacillus pleuropneumoniae. *FEMS microbiology letters* 143 (1), S. 1–6. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08452.x.
- Cho WS, Jung K, Kim J, Ha Y, Chae C (2005): Expression of mRNA encoding interleukin (IL)-10, IL-12p35 and IL-12p40 in lungs from pigs experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. *Veterinary research communications* 29 (2), S. 111–122.
- Chung JW, Ng-Thow-Hing C, Budman LI, Gibbs BF, Nash JH E, Jacques M, Coulton JW (2007): Outer membrane proteome of Actinobacillus pleuropneumoniae. LC-MS/MS analyses validate in silico predictions. *Proteomics* 7 (11), S. 1854–1865. DOI: 10.1002/pmic.200600979.
- Cleveland-Nielsen A, Nielsen EO, Ersbøll AK (2002): Chronic pleuritis in Danish slaughter pig herds. *Preventive veterinary medicine* 55 (2), S. 121–135.
- Cochran WG (1954): Some Methods for Strengthening the Common  $\chi^2$  Tests. *Biometrics* 10 (4), S. 417. DOI: 10.2307/3001616.
- Cockett NE, Jackson SP, Shay TL, Farnir F, Berghmans S, Snowden GD, Nielsen DM, Georges M (1996): Polar overdominance at the ovine callipyge locus. *Science (New York, N.Y.)* 273 (5272), S. 236–238.
- Cole RK (1968): Studies on Genetic Resistance to Marek's Disease. *Avian Diseases* 12 (1), S. 9. DOI: 10.2307/1588081.
- Crujnsen T, van Leengoed LAMG, Kamp EM, Bartelse A, Korevaar A, Verheijden JHM (1995): Susceptibility to Actinobacillus pleuropneumoniae infection in pigs from an endemically infected herd is related to the presence of toxin-neutralizing antibodies. *Veterinary Microbiology* 47 (3-4), S. 219–228. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00109-3.
- Crujnsen TL, van Leengoed LA, Dekker-Nooren TC, Schoevers EJ, Verheijden JH (1992): Phagocytosis and killing of Actinobacillus pleuropneumoniae by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infect. Immun.* 60 (11), S. 4867–4871.
- Cullen JM, Rycroft AN (1994): Phagocytosis by pig alveolar macrophages of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 2 mutant strains defective in haemolysin II (ApxII) and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology (Reading, England)* 140 (Pt 2), S. 237–244. DOI: 10.1099/13500872-140-2-237.
- Daetwyler HD, Capitan A, Pausch H, Stothard P, van Binsbergen B, Brøndum RF, Liao X, Djari A, Rodriguez SC, Grohs C, Esquerré D, Bouchez O, Rossignol M-N, Klopp C, Rocha D, Fritz S, Eggen A, Bowman PJ, Coote D, Chamberlain AJ, Anderson C, VanTassel CP, Hulsege I, Goddard ME, Guldbandsen B, Lund MS, Veerkamp RF, Boichard DA, Fries R, Hayes BJ (2014): Whole-genome

sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nature genetics* 46 (8), S. 858–865. DOI: 10.1038/ng.3034.

Dai CH, Wu JY, Zhao CX, Yu LH, Bao WB, Wu SL (2017): Nramp1 gene expression in different tissues of Meishan piglets from newborn to weaning. *Genetics and molecular research : GMR* 16 (1). DOI: 10.4238/gmr16019288.

Dalai B, Zhou R, Wan Y, Kang M, Li L, Li T, Zhang S, Chen H (2009): Histone-like protein H-NS regulates biofilm formation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial pathogenesis* 46 (3), S. 128–134. DOI: 10.1016/j.micpath.2008.11.005.

Daniłowicz E, Martinez-Arias R, Dolf G, Singh M, Probst I, Tümmler B, Höltig D, Waldmann K-H, Gerlach G-F, Stanke F, Leeb T (2010): Characterization of the porcine transferrin gene (TF) and its association with disease severity following an experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Animal genetics* 41 (4), S. 424–427. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2009.02012.x.

Davies G, Genini S, Bishop SC, Giuffra E (2009): An assessment of opportunities to dissect host genetic variation in resistance to infectious diseases in livestock. *Animal : an international journal of animal bioscience* 3 (3), S. 415–436. DOI: 10.1017/S1751731108003522.

Dayao D, Gibson JS, Blackall PJ, Turni C (2016): Antimicrobial resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* and *Pasteurella multocida* isolated from Australian pigs. *Australian veterinary journal* 94 (7), S. 227–231. DOI: 10.1111/avj.12458.

Deener HG, Potter AA (1989a): Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 57 (3), S. 798–804.

Deener HG, Potter AA (1989b): Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. *Microbial pathogenesis* 6 (6), S. 425–432.

DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernytzky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ (2011): A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics* 43 (5), S. 491–498. DOI: 10.1038/ng.806.

Desrosiers R MC (1998): Indirect transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Swine Health and Production* (6), 263–265.

Diarra MS, Dolence JA, Dolence EK, Darwish I, Miller MJ, Malouin F, Jacques M (1996): Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Applied and environmental microbiology* 62 (3), S. 853–859.

Dillio AA, Farhan SM K, Ghani M, Sato C, Liang E, Zhang M, McIntyre AD, Cao H, Racacho L, Robinson JF, Strong MJ, Masellis M, Bulman DE, Rogaeva E, Lang A, Tartaglia C, Finger E, Zinman L, Turnbull J, Freedman P, Swartz R, Black SE, Hegele RA (2018): Targeted Next-generation Sequencing and Bioinformatics Pipeline to Evaluate Genetic Determinants of Constitutional Disease. *Journal of visualized experiments : JoVE* (134). DOI: 10.3791/57266.

Doeschl-Wilson AB, Kyriazakis I, Vincent A, Rothschild MF, Thacker E, Galina-Pantoja L (2009): Clinical and pathological responses of pigs from two genetically diverse commercial lines to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Journal of animal science* 87 (5), S. 1638–1647. DOI: 10.2527/jas.2008-1447.

Dom P, Haesebrouck F (1992a): Comparative virulence of NAD-dependent and NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B* 39 (4), S. 303–306.

- Dom P, Haesebrouck F, Baetselier P de (1992b): Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. *American journal of veterinary research* 53 (7), S. 1113–1118.
- Dom P, Haesebrouck F, Kamp EM, Smits MA (1992c): Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytotoxins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infect. Immun.* 60 (10), S. 4328–4334.
- Donlan RM, Costerton JW (2002): Biofilms. Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* 15 (2), S. 167–193.
- Dreyfus A, Schaller A, Nivollet S, Segers RP A M, Kobisch M, Mieli L, Soerensen V, Hüsey D, Miserez R, Zimmermann W, Inderbitzin F, Frey J (2004): Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Veterinary Microbiology* 99 (3-4), S. 227–238. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.01.004.
- Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR, Gottschalk M (2000): *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides. Their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal health research reviews* 1 (2), S. 73–93.
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JJ, Nicolae DL, Cho JH (2006): A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science (New York, N.Y.)* 314 (5804), S. 1461–1463. DOI: 10.1126/science.1135245.
- Eck SH, Benet-Pagès A, Flisikowski K, Meitinger T, Fries R, Strom TM (2009): Whole genome sequencing of a single *Bos taurus* animal for single nucleotide polymorphism discovery. *Genome biology* 10 (8), S. R82. DOI: 10.1186/gb-2009-10-8-r82.
- Edfors-Lilja I, Wattrang E, Magnusson U, Fossum C (1994): Genetic variation in parameters reflecting immune competence of swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 40 (1), S. 1–16. DOI: 10.1016/0165-2427(94)90011-6.
- Enriquez-Verdugo I, Guerrero AL, Serrano JJ, Godínez D, Rosales JL, Tenorio V, La Garza M de (2004): Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 7), S. 2391–2400. DOI: 10.1099/mic.0.27053-0.
- Evans DM, Cardon LR (2004): Guidelines for genotyping in genomewide linkage studies: single-nucleotide-polymorphism maps versus microsatellite maps. *American journal of human genetics* 75 (4), S. 687–692. DOI: 10.1086/424696.
- Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL (2005): *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal health research reviews* 6 (1), S. 17–39.
- Falconer, D. S.; Mackay, Trudy F. C. (1996): Introduction to quantitative genetics. 4. ed., reprinted. Essex: Longman.
- Fenwick B, Henry S (1994): Porcine pleuropneumonia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204 (9), S. 1334–1340.
- Fittipaldi N, Klopfenstein C, Gottschalk M, Broes A, Paradis MA, Dick CP (2005): Assessment of the efficacy of tilmicosin phosphate to eliminate *Actinobacillus pleuropneumoniae* from carrier pigs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 69 (2), S. 146–150.

- Flori L, Rogel-Gaillard C, Cochet M, Lemonnier G, Hugot K, Chardon P, Robin S, Lefèvre F (2008a): Transcriptomic analysis of the dialogue between Pseudorabies virus and porcine epithelial cells during infection. *BMC genomics* 9, S. 123. DOI: 10.1186/1471-2164-9-123.
- Flori L, Rogel-Gaillard C, Mariani V, Lemonnier G, Cochet M, Hugot K, Chardon P, Robin S, Lefèvre F (2008b): A combined transcriptomic approach to analyse the dialogue between pseudorabies virus and porcine cells. *Developments in biologicals* 132, S. 99–104. DOI: 10.1159/000317149.
- Fossum C, Watranga E, Fuxler L, Jensen KT, Wallgren P (1998): Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine--a possible role for serum interleukin-6. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64 (2), S. 161–172.
- Frey J (1995): Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiology* 3 (7), S. 257–261. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)88939-8.
- Frey J (2003): Detection, Identification, and Subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Joachim Frey und Konrad Sachse (Hg.): PCR detection of microbial pathogens, Bd. 216. Totowa, N.J.: Humana Press (Methods in molecular biology, v. 216), S. 87–96.
- Frey J, Bosse JT, Chang YF, Cullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, Gygi D, Haesebrouck F, Inzana TJ, Jansen R (1993): *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins. Uniform designation of haemolysins, cytolytins, pleurotoxin and their genes. *Journal of general microbiology* 139 (8), S. 1723–1728. DOI: 10.1099/00221287-139-8-1723.
- Fuller TE, Martin S, Teel JF, Alaniz GR, Kennedy MJ, Lowery DE (2000): Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microbial pathogenesis* 29 (1), S. 39–51. DOI: 10.1006/mpat.2000.0364.
- Furesz SE, Mallard BA, Bossé JT, Rosendal S, Wilkie BN, MacInnes JI (1997): Antibody- and cell-mediated immune responses of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected and bacterin-vaccinated pigs. *Infect. Immun.* 65 (2), S. 358–365.
- Gabner S, Egerbacher M, Gasse H, Hewicker-Trautwein M, Höltig D, Waldmann K-H, Blecha F, Saalmüller A, Hennig-Pauka I (2017): Detection of PR-39, a porcine host defence peptide, in different cell sub-lineages in pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Histology and histopathology* 32 (10), S. 1077–1088. DOI: 10.14670/HH-11-869.
- Gao C, Jiang Q, Guo D, Liu J, Han L, Qu L (2014): Characterization of swine leukocyte antigen (SLA) polymorphism by sequence-based and PCR-SSP methods in Chinese Bama miniature pigs. *Developmental and comparative immunology* 45 (1), S. 87–96. DOI: 10.1016/j.dci.2014.02.006.
- Gardner IA, Bossé JT, Shelldrake RF, Rosendal S, Johnson RP (1991): Serological response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 infection in a commercial pig herd. *Australian Vet J* 68 (11), S. 349–352.
- Geldermann H, Müller E, Beeckmann P, Knorr C, Yue G, Moser G (1996): Mapping of quantitative-trait loci by means of marker genes in F2 generations of Wild boar, Pietrain and Meishan pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 113 (1-6), S. 381–387. DOI: 10.1111/j.1439-0388.1996.tb00629.x.
- Gerlach GF, Anderson C, Potter AA, Klashinsky S, Willson PJ (1992): Cloning and expression of a transferrin-binding protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 60 (3), S. 892–898.
- Gibbons RA, Sellwood R, Burrows M, Hunter PA (1977): Inheritance of resistance Inheritance of resistance to neonatal diarrhoea in the pig: Examination of the genetic system. *Theoretical and Applied Genetics* (81), S. 65–70.

- Gjedrem T (2015): Disease Resistant Fish and Shellfish Are within Reach. A Review. *JMSE* 3 (1), S. 146–153. DOI: 10.3390/jmse3010146.
- Gomez-Laguna J, Islas A, Munoz D, Ruiz A, Villamil A, Carrasco L, Quezada M (2014): Infection dynamics and acute phase response of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolate of moderate virulence in pigs. *Veterinary Microbiology* 173 (3-4), S. 332–339. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.08.015.
- Gottschalk M (2012): *Actinobacillosis*. L.Karriker, A. Ramirez, K. Schwartz, G. Stevenson & J. Zimmerman, *Diseases of Swine*.
- Gottschalk M (2015): The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 206 (1), S. 30–38. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.06.016.
- Gottschalk M, Lacouture S (2015): Canada: Distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* 56 (10), S. 1093–1094.
- Gregersen VR, Sørensen KK, Christensen OF, Busch ME, Vingborg RK K, Velandar IH, Lund MS, Bendixen C (2010): Identification of QTL for dorso-caudal chronic pleuritis in 12 crossbred porcine families. *Animal genetics* 41 (5), S. 509–514. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02028.x.
- Groenen MA M, Archibald AL, Uenishi H, Tuggle CK, Takeuchi Y, Rothschild MF, Rogel-Gaillard C, Park C, Milan D, Megens H-J, Li S, Larkin DM, Kim H, Frantz LA F, Caccamo M, Ahn H, Aken BL, Anselmo A, Anthon C, Auvil L, Badaoui B, Beattie CW, Bendixen C, Berman D, Blecha F, Blomberg J, Bolund L, Bosse M, Botti S, Bujie Z, Bystrom M, Capitanu B, Carvalho-Silva D, Chardon P, Chen C, Cheng R, Choi S-H, Chow W, Clark RC, Clee C, Crooijmans RP M A, Dawson HD, Dehais P, Sapio F de, Dibbits B, Drou N, Du Z-Q, Eversole K, Fadista J, Fairley S, Faraut T, Faulkner GJ, Fowler KE, Fredholm M, Fritz E, Gilbert JG R, Giuffra E, Gorodkin J, Griffin DK, Harrow JL, Hayward A, Howe K, Hu Z-L, Humphray SJ, Hunt T, Hornshøj H, Jeon J-T, Jern P, Jones M, Jurka J, Kanamori H, Kapetanovic R, Kim J, Kim J-H, Kim K-W, Kim T-H, Larson G, Lee K, Lee K-T, Leggett R, Lewin HA, Li Y, Liu W, Loveland JE, Lu Y, Lunney JK, Ma J, Madsen O, Mann K, Matthews L, McLaren S, Morozumi T, Murtaugh MP, Narayan J, Nguyen DT, Ni P, Oh S-J, Onteru S, Panitz F, Park E-W, Park H-S, Pascal G, Paudel Y, Perez-Enciso M, Ramirez-Gonzalez R, Reecy JM, Rodriguez-Zas S, Rohrer GA, Rund L, Sang Y, Schachtschneider K, Schraiber JG, Schwartz J, Scobie L, Scott C, Searle S, Servin B, Southey BR, Sperber G, Stadler P, Sweedler JV, Tafer H, Thomsen B, Wali R, Wang J, Wang J, White S, Xu X, Yerle M, Zhang G, Zhang J, Zhang J, Zhao S, Rogers J, Churcher C, Schook LB (2012): Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* 491 (7424), S. 393–398. DOI: 10.1038/nature11622.
- Haesebrouck F, Chiers K, van Overbeke I, Ducatelle R (1997): *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs. The role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology* 58 (2-4), S. 239–249. DOI: 10.1016/S0378-1135(97)00162-4.
- Haley CS, Andersson L (1997): Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals. *Genome Mapping*. Dear PH, ed. Oxford, New York, Tokio: IRL Press, S. 49–71.
- Hamer-Barrera R, Godínez D, Enríquez VI, Vaca-Pacheco S, Martínez-Zúñiga R, Talamás-Rohana P, Suárez-Güemez F, La Garza M de (2004): Adherence of *actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 68 (1), S. 33–41.
- Heegaard PM, Klausen J, Nielsen JP, González-Ramón N, Piñeiro M, Lampreave F, Alava MA (1998): The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of

- infection. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 119 (2), S. 365–373.
- Heegaard PM H, Stockmarr A, Piñeiro M, Carpintero R, Lampreave F, Campbell FM, Eckersall PD, Toussaint MJ M, Gruys E, Sorensen NS (2011): Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. *Veterinary research* 42, S. 50. DOI: 10.1186/1297-9716-42-50.
- Hennig-Pauka I, Jacobsen I, Blecha F, Waldmann K-H, Gerlach G-F (2006): Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Veterinary research* 37 (1), S. 75–87. DOI: 10.1051/vetres:2005043.
- Hennig-Pauka I, Koch R, Hoeltig D, Gerlach G-F, Waldmann K-H, Blecha F, Brauer C, Gasse H (2012): PR-39, a porcine host defence peptide, is prominent in mucosa and lymphatic tissue of the respiratory tract in healthy pigs and pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC research notes* 5, S. 539. DOI: 10.1186/1756-0500-5-539.
- Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J (2000): Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science* 64 (2-3), S. 95–106. DOI: 10.1016/S0301-6226(99)00128-1.
- Hoeltig D, Hennig-Pauka I, Thies K, Rehm T, Beyerbach M, Strutzberg-Minder K, Gerlach GF, Waldmann K-H (2009): A novel Respiratory Health Score (RHS) supports a role of acute lung damage and pig breed in the course of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *BMC veterinary research* 5, S. 14. DOI: 10.1186/1746-6148-5-14.
- Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann E, Zimmerman JJ, Rotto H, Yoder TK, Wang C, Yeske P, Mowrer CL, and Haley CA (2013): Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production* (21), S. 72–84.
- Hu ZL, Hasler-Rapacz J, Huang SC, Rapacz J (1993): Studies in swine on inheritance and variation in expression of small intestinal receptors mediating adhesion of the K88 enteropathogenic *Escherichia coli* variants. *The Journal of heredity* 84 (3), S. 157–165. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111309.
- Hultén C, Johansson E, Fossum C, Wallgren P (2003): Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 95 (1-2), S. 75–89.
- Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C (2009): Silent (synonymous) SNPs. Should we care about them? *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 578, S. 23–39. DOI: 10.1007/978-1-60327-411-1\_2.
- Ikegawa S (2012): A Short History of the Genome-Wide Association Study: Where We Were and Where We Are Going. *Genomics & Informatics* 10 (4), S. 220–225. DOI: 10.5808/GI.2012.10.4.220.
- International HapMap Consortium (2003): The International HapMap Project. *Nature* 426 (6968), S. 789–796. DOI: 10.1038/nature02168.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 (7011), S. 931–945. DOI: 10.1038/nature03001.
- Inzana TJ (1990): Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 54 Suppl, S22-7.
- Ito H, Ogawa T, Fukamizu D, Morinaga Y, Kusumoto M (2016): Nucleotide sequence analysis of a DNA region involved in capsular polysaccharide biosynthesis reveals the molecular basis of the

- nontypeability of two *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 28 (6), S. 632–637. DOI: 10.1177/1040638716656026.
- Izano EA, Sadovskaya I, Vinogradov E, Mulks MH, Velliyagounder K, Ragunath C, Kher WB, Ramasubbu N, Jabbouri S, Perry MB, Kaplan JB (2007): Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial pathogenesis* 43 (1), S. 1–9. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.02.004.
- Jacobsen I, Hennig-Pauka I, Baltes N, Trost M, Gerlach G-F (2005): Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. *Infect. Immun.* 73 (1), S. 226–234. DOI: 10.1128/IAI.73.1.226-234.2005.
- Jacobsen MJ, Nielsen JP, Nielsen R (1996): Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model. *Veterinary Microbiology* 49 (3-4), S. 159–168. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00184-0.
- Jacques M, Paradis SE (1998): Adhesin-receptor interactions in Pasteurellaceae. *FEMS microbiology reviews* 22 (1), S. 45–59. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1998.tb00360.x.
- Jain M, Olsen HE, Turner DJ, Stoddart D, Bulazel KV, Paten B, Haussler D, Willard HF, Akeson M, Miga KH (2018): Linear assembly of a human centromere on the Y chromosome. *Nature Biotechnology* 36, 321 EP -. DOI: 10.1038/nbt.4109.
- Jiang Y, Xie M, Chen W, Talbot R, Maddox JF, Faraut T, Wu C, Muzny DM, Li Y, Zhang W, Stanton J-A, Brauning R, Barris WC, Hourlier T, Aken BL, Searle SM J, Adelson DL, Bian C, Cam GR, Chen Y, Cheng S, DeSilva U, Dixon K, Dong Y, Fan G, Franklin IR, Fu S, Guan R, Highland MA, Holder ME, Huang G, Ingham AB, Jhangiani SN, Kalra D, Kovar CL, Lee SL, Liu W, Liu X, Lu C, Lv T, Mathew T, McWilliam S, Menzies M, Pan S, Robelin D, Servin B, Townley D, Wang W, Wei B, White SN, Yang X, Ye C, Yue Y, Zeng P, Zhou Q, Hansen JB, Kristensen K, Gibbs RA, Flicek P, Warkup CC, Jones HE, Oddy VH, Nicholas FW, McEwan JC, Kijas J, Wang J, Worley KC, Archibald AL, Cockett N, Xu X, Wang W, Dalrymple BP (2014): The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. *Science (New York, N.Y.)* 344 (6188), S. 1168–1173. DOI: 10.1126/science.1252806.
- Jirawattanapong P, Stockhofe N, Leengoed L, Binnendijk GP, Wisselink H, Raymakers R, Cruijssen T, C.M.C. P-S, Nes A, Nielsen M (2008): Efficacy of a subunit vaccine *Actinobacillus pleuropneumoniae* in an endemically infected swine herd. *Journal of Swine Health and Production* 16.
- Johnson RC, Nelson GW, Troyer JL, Lautenberger JA, Kessing BD, Winkler CA, O'Brien SJ (2010): Accounting for multiple comparisons in a genome-wide association study (GWAS). *BMC genomics* 11, S. 724. DOI: 10.1186/1471-2164-11-724.
- Jones JE (1969): The incidence and nature of diseases causing death in pigs aged 2-7 months in a commercial herd. *The British veterinary journal* 125 (10), S. 492–503.
- Kadarmideen HN, Ali AA, Thomson PC, Müller B, Zinsstag J (2011): Polymorphisms of the SLC11A1 gene and resistance to bovine tuberculosis in African Zebu cattle. *Animal genetics* 42 (6), S. 656–658. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2011.02203.x.
- Kahlisch D, Buettner FF R, Naim HY, Gerlach G-F (2009): Glycoprotein analysis of porcine bronchoalveolar lavage fluid reveals potential biomarkers corresponding to resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Veterinary research* 40 (6), S. 60. DOI: 10.1051/vetres/2009043.
- Kaplan JB, Mulks MH (2005): Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 108 (1-2), S. 89–94. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.02.011.

- Kaplan JB, Velliyagounder K, Ragunath C, Rohde H, Mack D, Knobloch JK-M, Ramasubbu N (2004): Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *Journal of bacteriology* 186 (24), S. 8213–8220. DOI: 10.1128/JB.186.24.8213-8220.2004.
- Khibnik AI, Kondrashov AS (1997): Three mechanisms of Red Queen dynamics. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 264 (1384), S. 1049–1056. DOI: 10.1098/rspb.1997.0145.
- Klinkenberg D, Tobias TJ, Bouma A, van Leengoed LA M G, Stegeman JA (2014): Simulation study of the mechanisms underlying outbreaks of clinical disease caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in finishing pigs. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 202 (1), S. 99–105. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.06.015.
- Klitgaard K, Friis C, Jensen TK, Angen Ø, Boye M (2012): Transcriptional portrait of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during acute disease--potential strategies for survival and persistence in the host. *PLoS one* 7 (4), e35549. DOI: 10.1371/journal.pone.0035549.
- Komal JPS, Mittal KR (1990): Studies on the interactions of two different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 13 (1), S. 25–34. DOI: 10.1016/0147-9571(90)90005-E.
- Korte A, Farlow A (2013): The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant methods* 9, S. 29. DOI: 10.1186/1746-4811-9-29.
- Kristensen CS, Angen Ø, Andreassen M, Takai H, Nielsen JP, Jorsal SE (2004): Demonstration of airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 between simulated pig units located at close range. *Veterinary Microbiology* 98 (3-4), S. 243–249. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.10.026.
- Lauritzen B, Lykkesfeldt J, Skaanild MT, Angen Ø, Nielsen JP, Friis C (2003): Putative biomarkers for evaluating antibiotic treatment. An experimental model of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Research in Veterinary Science* 74 (3), S. 261–270.
- Lechtenberg KF, Shryock TR, Moore G (1994): Characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* seeder pig challenge-exposure model. *American journal of veterinary research* 55 (12), S. 1703–1709.
- Lee G-L, Wu J-Y, Yeh C-C, Kuo C-C (2016): TLR4 induces CREB-mediated IL-6 production via upregulation of F-spondin to promote vascular smooth muscle cell migration. *Biochemical and biophysical research communications* 473 (4), S. 1205–1210. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.040.
- Li H, Durbin R (2009a): Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (14), S. 1754–1760. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R (2009b): The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (16), S. 2078–2079. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Liao F, Ali J, Greene T, Muller WA (1997): Soluble Domain 1 of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) Is Sufficient to Block Transendothelial Migration In Vitro and In Vivo. *The Journal of experimental medicine* 185 (7), S. 1349–1358.
- Liggett AD, Harrison LR, Farrell RL (1987): Sequential study of lesion development in experimental haemophilus pleuropneumonia. *Research in Veterinary Science* 42 (2), S. 204–212.

- Lignières, J., G. Spitz. (1902): L'Actinobacillose. *Bulletin et mémoires. Société Centrale de Médecine Vétérinaire*. (20), 487–535 and 546–565.
- Lillico SG, Proudfoot C, Carlson DF, Stverakova D, Neil C, Blain C, King TJ, Ritchie WA, Tan W, Mileham AJ, McLaren DG, Fahrenkrug SC, Whitelaw CB A (2013): Live pigs produced from genome edited zygotes. *Scientific reports* 3, S. 2847. DOI: 10.1038/srep02847.
- Lillico SG, Proudfoot C, King TJ, Tan W, Zhang L, Mardjuki R, Paschon DE, Rebar EJ, Urnov FD, Mileham AJ, McLaren DG, Whitelaw CB A (2016): Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing. *Scientific reports* 6, S. 21645. DOI: 10.1038/srep21645.
- Lim KH, Ferraris L, Filloux ME, Raphael BJ, Fairbrother WG (2011): Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (27), S. 11093–11098. DOI: 10.1073/pnas.1101135108.
- Liu J, Chen X, Tan C, Guo Y, Chen Y, Fu S, Bei W, Chen H (2009): In vivo induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 137 (3-4), S. 282–289. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.01.011.
- Lone AG, Deslandes V, Nash JH E, Jacques M, Macinnes JI (2009a): malT knockout mutation invokes a stringent type gene-expression profile in *Actinobacillus pleuropneumoniae* in bronchoalveolar fluid. *BMC microbiology* 9, S. 195. DOI: 10.1186/1471-2180-9-195.
- Lone AG, Deslandes V, Nash JH E, Jacques M, Macinnes JI (2009b): Modulation of gene expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposed to bronchoalveolar fluid. *PLoS one* 4 (7), e6139. DOI: 10.1371/journal.pone.0006139.
- López-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigó R (2005): Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS letters* 579 (9), S. 1900–1903. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.02.047.
- López-Soria S, Segalés J, Nofrarias M, Calsamiglia M, Ramírez H, Mínguez A, Serrano IM, Marín O, Callén A (2004): Genetic influence on the expression of PCV disease. *The Veterinary record* 155 (16), S. 504.
- Losinger WC (2005): Economic impacts of reduced pork production associated with the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on grower/finisher swine operations in the United States. *Preventive veterinary medicine* 68 (2-4), S. 181–193. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2004.12.004.
- Lovelace MD, Yap ML, Yip J, Muller W, Wijburg O, Jackson DE (2013): Absence of platelet endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1/CD31, in vivo increases resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. *Infection and immunity* 81 (6), S. 1952–1963. DOI: 10.1128/IAI.01295-12.
- Lowe JE, Husmann R, Firkins LD, Zuckermann FA, Goldberg TL (2005): Correlation of cell-mediated immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus with protection against reproductive failure in sows during outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome in commercial herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226 (10), S. 1707–1711.
- Lu X, Liu J, Fu W, Zhou J, Luo Y, Ding X, Liu Y, Zhang Q (2013): Genome-wide association study for cytokines and immunoglobulin G in swine. *PLoS one* 8 (10), e74846. DOI: 10.1371/journal.pone.0074846.
- Luna-Castro S, Aguilar-Romero F, Samaniego-Barrón L, Godínez-Vargas D, La Garza M de (2014): Effect of bovine apo-lactoferrin on the growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

*Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 27 (5), S. 891–903. DOI: 10.1007/s10534-014-9752-5.

Lunney JK, Fang Y, Ladinig A, Chen N, Li Y, Rowland B, Renukaradhya GJ (2016): Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4 (1), S. 129–154. DOI: 10.1146/annurev-animal-022114-111025.

Lunney J. K., Murrel K.D. (1988): Immunogenetic analysis of *Trichinella spiralis* infections in swine. *Veterinary Parasitology* (29), S. 179–193.

Lvovs D, Favorova OO, Favorov AV (2012): A Polygenic Approach to the Study of Polygenic Diseases. *Acta naturae* 4 (3), S. 59–71.

Lynch, Michael; Walsh, Bruce (1998): Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland, Mass.: Sinauer Assoc.

Maas A, Jacobsen ID, Meens J, Gerlach G-F (2006a): Use of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* multiple mutant as a vaccine that allows differentiation of vaccinated and infected animals. *Infection and immunity* 74 (7), S. 4124–4132. DOI: 10.1128/IAI.00133-06.

Maas A, Meens J, Baltés N, Hennig-Pauka I, Gerlach G-F (2006b): Development of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vaccine* 24 (49-50), S. 7226–7237. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.06.047.

Maas M, Stapleton M, Bergom C, Mattson DL, Newman DK, Newman PJ (2005): Endothelial cell PECAM-1 confers protection against endotoxic shock. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 288 (1), H159-64. DOI: 10.1152/ajpheart.00500.2004.

Madden KB, Murrell KD, Lunney JK (1990): *Trichinella spiralis*: major histocompatibility complex-associated elimination of encysted muscle larvae in swine. *Experimental parasitology* 70 (4), S. 443–451.

Makoschey B. (2015): Modes of vaccine administration at a glance. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* (128).

Maldonado J, Valls L, Martínez E, Riera P (2009): Isolation rates, serovars, and toxin genotypes of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* among pigs suffering from pleuropneumonia in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21 (6), S. 854–857. DOI: 10.1177/104063870902100615.

Mallard BA, Wilkie BN, Kennedy BW, Quinton M (1992): Use of estimated breeding values in a selection index to breed Yorkshire pigs for high and low immune and innate resistance factors. *Animal Biotechnology* 3 (2), S. 257–280. DOI: 10.1080/10495399209525776.

Martínez R, Dunner S, Toro R, Tobón J, Gallego J, Cañón J (2010): Effect of polymorphisms in the *Slc11a1* coding region on resistance to brucellosis by macrophages in vitro and after challenge in two Bos breeds (Blanco Orejinegro and Zebu). *Genetics and molecular biology* 33 (3), S. 463–470. DOI: 10.1590/S1415-47572010000300014.

Martins CL, Lawman MJ, Scholl T, Mebus CA, Lunney JK (1993): African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Archives of virology* 129 (1-4), S. 211–225.

McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA (2010): The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research* 20 (9), S. 1297–1303. DOI: 10.1101/gr.107524.110.

- McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR S, Thormann A, Flicek P, Cunningham F (2016): The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome biology* 17 (1), S. 122. DOI: 10.1186/s13059-016-0974-4.
- Meeker DL, Rothschild MF, Christian LL, Warner CM, Hill HT (1987a): Genetic control of immune response to pseudorabies and atrophic rhinitis vaccines: I. Heterosis, general combining ability and relationship to growth and backfat. *Journal of animal science* 64 (2), S. 407–413. DOI: 10.2527/jas1987.642407x.
- Meeker DL, Rothschild MF, Christian LL, Warner CM, Hill HT (1987b): Genetic control of immune response to pseudorabies and atrophic rhinitis vaccines: II. Comparison of additive direct and maternal genetic effects. *Journal of animal science* 64 (2), S. 414–419. DOI: 10.2527/jas1987.642414x.
- Meijerink E, Fries R, Vögeli P, Masabanda J, Wigger G, Stricker C, Neuenschwander S, Bertschinger HU, Stranzinger G (1997): Two  $\alpha(1,2)$  fucosyltransferase genes on porcine Chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. *Mammalian Genome* 8 (10), S. 736–741. DOI: 10.1007/s003359900556.
- Meriardi G, Dottori M, Bonilauri P, Luppi A, Gozio S, Pozzi P, Spaggiari B, Martelli P (2012): Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 193 (1), S. 234–239. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.11.009.
- Milenko Z, Ruzica A, N. M, V. I, Branka V, Jadranka Z, Jelena A (2008): Isolation and identification of Actinobacillus pleuropneumoniae in pig's lungs at farms and their sensitivity to antibiotics. *Acta vet. (Beogr.)* 58 (5-6), S. 499–507. DOI: 10.2298/AVB0806499Z.
- Moeck GS, Coulton JW (1998): TonB-dependent iron acquisition. Mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Molecular microbiology* 28 (4), S. 675–681.
- Morris CA (2007): A review of genetic resistance to disease in Bos taurus cattle. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 174 (3), S. 481–491. DOI: 10.1016/j.tvjl.2006.09.006.
- Mueller JC (2004): Linkage disequilibrium for different scales and applications. *Briefings in bioinformatics* 5 (4), S. 355–364. DOI: 10.1093/bib/5.4.355.
- Mukai T, Toba T, Ohori H (1997): Collagen binding of Bifidobacterium adolescentis. *Current microbiology* 34 (5), S. 326–331.
- Mullen LM, Bossé JT, Nair SP, Ward JM, Rycroft AN, Robertson G, Langford PR, Henderson B (2008): Pasteurellaceae ComE1 proteins combine the properties of fibronectin adhesins and DNA binding competence proteins. *PLoS one* 3 (12), e3991. DOI: 10.1371/journal.pone.0003991.
- Müller M, Brem G (1991): Disease resistance in farm animals. *Experientia* 47 (9), S. 923–934. DOI: 10.1007/bf01929883.
- Nagy B, Fekete PZ (2005): Enterotoxigenic Escherichia coli in veterinary medicine. *International journal of medical microbiology : IJMM* 295 (6-7), S. 443–454. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.07.003.
- Negrete-Abascal E, Tenorio VR, Guerrero AL, García RM, Reyes ME, La Garza M de (1998): Purification and characterization of a protease from Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 62 (3), S. 183–190.
- Negrete-Abascal E, Tenorio VR, Serrano JJ, García C, La Garza M de (1994): Secreted proteases from Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and

- immunoglobulin A. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 58 (2), S. 83–86.
- Newton JP, Buckley CD, Jones EY, Simmons DL (1997): Residues on Both Faces of the First Immunoglobulin Fold Contribute to Homophilic Binding Sites of PECAM-1/CD31. *J. Biol. Chem.* 272 (33), S. 20555–20563. DOI: 10.1074/jbc.272.33.20555.
- Nicolet J, König H, School E (1969): Zur Hämophilus-Pleuropneumonie beim Schwein. II. Eine kontagiöse Krankheit von wirtschaftlicher Bedeutung. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 111 (3), S. 166–174.
- Nogal ML, González de Buitrago G, Rodríguez C, Cubelos B, Carrascosa AL, Salas ML, Revilla Y (2001): African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *Journal of virology* 75 (6), S. 2535–2543. DOI: 10.1128/JVI.75.6.2535-2543.2001.
- Ondrackova P, Leva L, Kucerova Z, Vicenova M, Mensikova M, Faldyna M (2013): Distribution of porcine monocytes in different lymphoid tissues and the lungs during experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and the role of chemokines. *Veterinary research* 44, S. 98. DOI: 10.1186/1297-9716-44-98.
- O'Neill C, Jones SC P, Bossé JT, Watson CM, Williamson SM, Rycroft AN, Kroll JS, Hartley HM, Langford PR (2010): Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars in England and Wales. *The Veterinary record* 167 (17), S. 661–662. DOI: 10.1136/vr.c5106.
- Opriessnig T, Fenaux M, Thomas P, Hoogland MJ, Rothschild MF, Meng XJ, Halbur PG (2006): Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Veterinary pathology* 43 (3), S. 281–293. DOI: 10.1354/vp.43-3-281.
- Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Rothschild M, Kuhar D, Lunney JK, Juhan NM, Meng XJ, Halbur PG (2009): Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *Journal of animal science* 87 (5), S. 1582–1590. DOI: 10.2527/jas.2008-1390.
- Ørskov Ida, Ørskov F, Sojka WJ, Wittig W (1964): K Antigens K88ab(L) AND K88ac(L) IN E. coli. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 62 (3), S. 439–447. DOI: 10.1111/apm.1964.62.3.439.
- Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, Sato H, Sato H, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T (2002): Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature genetics* 32 (4), S. 650–654. DOI: 10.1038/ng1047.
- Palgrave CJ, Gilmour L, Lowden CS, Lillico SG, Mellencamp MA, Whitelaw CB A (2011): Species-specific variation in RELA underlies differences in NF-κB activity: a potential role in African swine fever pathogenesis. *Journal of virology* 85 (12), S. 6008–6014. DOI: 10.1128/JVI.00331-11.
- Paradis SE, Dubreuil D, Rioux S, Gottschalk M, Jacques M (1994): High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infection and immunity* 62 (8), S. 3311–3319.
- Paradis SE, Dubreuil JD, Gottschalk M, Archambault M, Jacques M (1999): Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors. *Current microbiology* 39 (6), S. 313–320.
- Peng Q-L, Ren J, Yan X-M, Huang X, Tang H, Wang Y-Z, Zhang B, Huang L-S (2007): The g.243AG mutation in intron 17 of MUC4 is significantly associated with susceptibility/resistance to ETEC F4ab/ac infection in pigs. *Animal genetics* 38 (4), S. 397–400. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2007.01608.x.

Perry MB, Angen Ø, MacLean LL, Lacouture S, Kokotovic B, Gottschalk M (2012): An atypical biotype of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13 is present in North America. *Veterinary Microbiology* 156 (3-4), S. 403–410. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.11.024.

Petry DB, Lunney J, Boyd P, Kuhar D, Blankenship E, Johnson RK (2007): Differential immunity in pigs with high and low responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Journal of animal science* 85 (9), S. 2075–2092. DOI: 10.2527/jas.2006-721.

Pohl S, Bertschinger HU, Frederiksen W, Mannheim W (1983): Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-Like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the Basis of Phenotypic and Deoxyribonucleic Acid Relatedness. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33 (3), S. 510–514. DOI: 10.1099/00207713-33-3-510.

Pooley, Christopher M.; Marion, Glenn; Bishop, Stephen C.; Bailey, Richard I.; Doeschl-Wilson, Andrea B. (2019): Estimating individuals' genetic and non-genetic effects underlying infectious disease transmission from temporal epidemic data (363).

Poplin, Ryan; Ruano-Rubio, Valentin; DePristo, Mark A.; Fennell, Tim J.; Carneiro, Mauricio O.; van der Auwera, Geraldine A.; Kling, David E.; Gauthier, Laura D.; Levy-Moonshine, Ami; Roazen, David; Shakir, Khalid; Thibault, Joel; Chandran, Sheila; Whelan, Chris; Lek, Monkol; Gabriel, Stacey; Daly, Mark J.; Neale, Benjamin; MacArthur, Daniel G.; Banks, Eric (2017): Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples.

Powell PP, Dixon LK, Parkhouse RM (1996): An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *Journal of virology* 70 (12), S. 8527–8533.

Prather RS, Rowland RR R, Ewen C, Tribble B, Kerrigan M, Bawa B, Teson JM, Mao J, Lee K, Samuel MS, Whitworth KM, Murphy CN, Egen T, Green JA (2013): An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of virology* 87 (17), S. 9538–9546. DOI: 10.1128/JVI.00177-13.

Provost M, Harel J, Labrie J, Sirois M, Jacques M (2003): Identification, cloning and characterization of *rfaE* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, a gene involved in lipopolysaccharide inner-core biosynthesis. *FEMS microbiology letters* 223 (1), S. 7–14. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00247-7.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA R, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker, Paul I W, Daly MJ, Sham PC (2007): PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* 81 (3), S. 559–575. DOI: 10.1086/519795.

Ramjeet M, Cox AD, Hancock MA, Mourez M, Labrie J, Gottschalk M, Jacques M (2008a): Mutation in the LPS outer core biosynthesis gene, *galU*, affects LPS interaction with the RTX toxins *ApxI* and *ApxII* and cytolytic activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Molecular microbiology* 70 (1), S. 221–235. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06409.x.

Ramjeet M, Deslandes V, Gouré J, Jacques M (2008b): *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines. From bacterins to new insights into vaccination strategies. *Animal health research reviews* 9 (1), S. 25–45. DOI: 10.1017/S1466252307001338.

Ramjeet M, Deslandes V, St Michael F, Cox AD, Kobisch M, Gottschalk M, Jacques M (2005): Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *The Journal of biological chemistry* 280 (47), S. 39104–39114. DOI: 10.1074/jbc.M502852200.

- Rampoldi A, Jacobsen MJ, Bertschinger HU, Joller D, Bürgi E, Vögeli P, Andersson L, Archibald AL, Fredholm M, Jørgensen CB, Neuenschwander S (2011): The receptor locus for *Escherichia coli* F4ab/F4ac in the pig maps distal to the MUC4-LMLN region. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 22 (1-2), S. 122–129. DOI: 10.1007/s00335-010-9305-3.
- Reiner G (2009): Investigations on genetic disease resistance in swine—A contribution to the reduction of pain, suffering and damage in farm animals. *Applied Animal Behaviour Science* 118 (3-4), S. 217–221. DOI: 10.1016/j.applanim.2009.02.011.
- Reiner G, Bertsch N, Hoeltig D, Selke M, Willems H, Gerlach GF, Tuemmler B, Probst I, Herwig R, Drungowski M, Waldmann KH (2014a): Identification of QTL affecting resistance/susceptibility to acute *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 25 (3-4), S. 180–191. DOI: 10.1007/s00335-013-9497-4.
- Reiner G, Dreher F, Drungowski M, Hoeltig D, Bertsch N, Selke M, Willems H, Gerlach GF, Probst I, Tuemmler B, Waldmann K-H, Herwig R (2014b): Pathway deregulation and expression QTLs in response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 25 (11-12), S. 600–617. DOI: 10.1007/s00335-014-9536-9.
- Reiner G, Fresen C, Bronnert S, Haack I, Willems H (2010): Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *Journal of wildlife diseases* 46 (2), S. 551–555. DOI: 10.7589/0090-3558-46.2.551.
- Reiner G, Kliemt D, Willems H, Berge T, Fischer R, Köhler F, Hepp S, Hertrampf B, Dausgries A, Geldermann H, Mackenstedt U, Zahner H (2007): Mapping of quantitative trait loci affecting resistance/susceptibility to *Sarcocystis miescheriana* in swine. *Genomics* 89 (5), S. 638–646. DOI: 10.1016/j.ygeno.2007.01.011.
- Reiner G, Melchinger E, Kramarova M, Pfaff E, Büttner M, Saalmüller A, Geldermann H (2002): Detection of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to pseudorabies virus in swine. *The Journal of general virology* 83 (Pt 1), S. 167–172. DOI: 10.1099/0022-1317-83-1-167.
- Reiner G (2003): Evaluierung und Nutzung der natürlichen Krankheitsresistenz beim Schwein – aktueller Stand und Möglichkeiten. *Tierärztliche Praxis* (31), S. 151–157.
- Reiss PT, Schwartzman A, Lu F, Huang L, Proal E (2012): Paradoxical results of adaptive false discovery rate procedures in neuroimaging studies. *NeuroImage* 63 (4), S. 1833–1840. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2012.07.040.
- Rioux S, Galarneau C, Harel J, Kobisch M, Frey J, Gottschalk M, Jacques M (2000): Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microbial pathogenesis* 28 (5), S. 279–289. DOI: 10.1006/mpat.1999.0347.
- Rothschild MF, Hill HT, Christian LL, Warner CM (1984): Genetic differences in serum-neutralization titers of pigs after vaccination with pseudorabies modified live-virus vaccine. *American journal of veterinary research* 45 (6), S. 1216–1218.
- Rycroft AN, Cullen JM (1990): Complement resistance in *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* infection of swine. *American journal of veterinary research* 51 (9), S. 1449–1453.
- Rycroft AN, Garside LH (2000): *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 159 (1), S. 18–36. DOI: 10.1053/tvjl.1999.0403.

- Saelao P, Wang Y, Chanthavixay G, Gallardo RA, Wolc A, Dekkers JC M, Lamont SJ, Kelly T, Zhou H (2019): Genetics and Genomic Regions Affecting Response to Newcastle Disease Virus Infection under Heat Stress in Layer Chickens. *Genes* 10 (1). DOI: 10.3390/genes10010061.
- Sánchez-Torres C, Gómez-Puertas P, Gómez-del-Moral M, Alonso F, Escribano JM, Ezquerro A, Domínguez J (2003): Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Archives of virology* 148 (12), S. 2307–2323. DOI: 10.1007/s00705-003-0188-4.
- Sarkozi R, Makrai L, Fodor L (2015): Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus Pleuropneumoniae*: Serovar 16. *Acta veterinaria Hungarica* 63 (4), S. 444–450. DOI: 10.1556/004.2015.041.
- Sassu EL, Bossé JT, Tobias TJ, Gottschalk M, Langford PR, Hennig-Pauka I (2017a): Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges. *Transboundary and emerging diseases*. DOI: 10.1111/tbed.12739.
- Sassu EL, Frömbling J, Duvigneau JC, Miller I, Müllebner A, Gutiérrez AM, Grunert T, Patzl M, Saalmüller A, Altrock A von, Menzel A, Ganter M, Spergser J, Hewicker-Trautwein M, Verspohl J, Ehling-Schulz M, Hennig-Pauka I (2017b): Host-pathogen interplay at primary infection sites in pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC veterinary research* 13 (1), S. 64. DOI: 10.1186/s12917-017-0979-6.
- Sassu EL, Ladinig A, Talker SC, Stadler M, Knecht C, Stein H, Frömbling J, Richter B, Spergser J, Ehling-Schulz M, Graage R, Hennig-Pauka I, Gerner W (2017c): Frequency of Th17 cells correlates with the presence of lung lesions in pigs chronically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary research* 48 (1), S. 4. DOI: 10.1186/s13567-017-0411-z.
- Schaller A, Kuhn R, Kuhnert P, Nicolet J, Anderson TJ, MacInnes JJ, Segers RP, Frey J (1999): Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology (Reading, England)* 145 (Pt 8), S. 2105–2116. DOI: 10.1099/13500872-145-8-2105.
- Schaller A, Kuhnert P, La Puente-Redondo VA de, Nicolet J, Frey J (2000): Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. *Veterinary Microbiology* 74 (4), S. 365–376.
- Schroyen M, Steibel JP, Koltjes JE, Choi I, Raney NE, Easley C, Fritz-Waters E, Reecy JM, Dekkers JC M, Rowland RR R, Lunney JK, Ernst CW, Tuggle CK (2015): Whole blood microarray analysis of pigs showing extreme phenotypes after a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *BMC genomics* 16, S. 516. DOI: 10.1186/s12864-015-1741-8.
- Schryvers AB, Gonzalez GC (1990): Receptors for transferrin in pathogenic bacteria are specific for the host's protein. *Canadian journal of microbiology* 36 (2), S. 145–147.
- Schulze-Koops H, Burkhardt H, Heesemann J, Mark K von der, Emmrich F (1992): Plasmid-encoded outer membrane protein YadA mediates specific binding of enteropathogenic yersiniae to various types of collagen. *Infect. Immun.* 60 (6), S. 2153–2159.
- Schuster SC (2008): Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods* 5 (1), S. 16–18. DOI: 10.1038/nmeth1156.
- Sciutto E, Martínez JJ, Huerta M, Avila R, Fragoso G, Villalobos N, Aluja A de, Larralde C (2003): Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Veterinary Parasitology* 116 (3), S. 223–229.

- Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S (1998): Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect. Immun.* 66 (6), S. 2887–2894.
- Seedorf J (2013): Wirkung von atmosphärischem Ammoniak auf Nutztiere—eine Kurzübersicht. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 126 (3-4), S. 96–103.
- Sellwood R (1982): *Escherichia coli*-associated porcine neonatal diarrhea: antibacterial activities of colostrum from genetically susceptible and resistant sows. *Infect. Immun.* 35 (2), S. 396–401.
- Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution (2004). *Nature* 432 (7018), S. 695–716.
- Shao M, Wang Y, Wang C, Guo Y, Peng Y, Liu J, Li G, Liu H, Liu S (2010): Evaluation of multicomponent recombinant vaccines against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Acta veterinaria Scandinavica* 52, S. 52. DOI: 10.1186/1751-0147-52-52.
- Sheehan BJ, Bossé JT, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR (2003): Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. *Infect. Immun.* 71 (7), S. 3960–3970.
- Shinkai H, Matsumoto T, Toki D, Okumura N, Terada K, Uenishi H (2015): Porcine NOD1 polymorphisms with impaired ligand recognition and their distribution in pig populations. *Molecular immunology* 63 (2), S. 305–311. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.07.020.
- Shinkai H, Muneta Y, Suzuki K, Eguchi-Ogawa T, Awata T, Uenishi H (2006): Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: complete sequencing of genomic region and expression analysis. *Molecular immunology* 43 (9), S. 1474–1480. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.09.006.
- Shope RE (1964): Porcine Contagious Pleuropneumonia. I. Experimental Transmission, Etiology, and Pathology. *The Journal of experimental medicine* 119, S. 357–368.
- Sillén A, Andrade J, Lilius L, Forsell C, Axelman K, Odeberg J, Winblad B, Graff C (2008): Expanded high-resolution genetic study of 109 Swedish families with Alzheimer's disease. *European journal of human genetics : EJHG* 16 (2), S. 202–208. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201946.
- Sjölund M, Wallgren P (2010): Field experience with two different vaccination strategies aiming to control infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a fattening pig herd. *Acta veterinaria Scandinavica* 52, S. 23. DOI: 10.1186/1751-0147-52-23.
- Sjölund M, Zoric M, Persson M, Karlsson G, Wallgren P (2011): Disease patterns and immune responses in the offspring to sows with high or low antibody levels to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Research in Veterinary Science* 91 (1), S. 25–31. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.07.025.
- Skallerup P, Nejsum P, Jørgensen CB, Göring HHH, Karlskov-Mortensen P, Archibald AL, Fredholm M, Thamsborg SM (2012): Detection of a quantitative trait locus associated with resistance to *Ascaris suum* infection in pigs. *International journal for parasitology* 42 (4), S. 383–391. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.02.010.
- Skamene E, Gros P, Forget A, Kongshavn PA L, St Charles C, Taylor BA (1982): Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* 297 (5866), S. 506–509. DOI: 10.1038/297506a0.
- Skovgaard K, Mortensen S, Boye M, Hedegaard J, Heegaard PM H (2010): Hepatic gene expression changes in pigs experimentally infected with the lung pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* as analysed with an innate immunity focused microarray. *Innate immunity* 16 (6), S. 343–353. DOI: 10.1177/1753425909342730.

- Smigoc Schweiger D, Mendez A, Kunilo Jamnik S, Bratanic N, Bratina N, Battelino T, Breclj J, Vidan-Jeras B (2016): High-risk genotypes HLA-DR3-DQ2/DR3-DQ2 and DR3-DQ2/DR4-DQ8 in co-occurrence of type 1 diabetes and celiac disease. *Autoimmunity* 49 (4), S. 240–247. DOI: 10.3109/08916934.2016.1164144.
- Smith HW, Halls S (1968): The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease. *Journal of medical microbiology* 1 (1), S. 45–59. DOI: 10.1099/00222615-1-1-45.
- Smith TF, Waterman MS (1981): Identification of common molecular subsequences. *Journal of molecular biology* 147 (1), S. 195–197. DOI: 10.1016/0022-2836(81)90087-5.
- Sørensen KK, Gregersen VR, Christensen OF, Velander IH, Bendixen C (2011): Genomic regions associated with ventro-cranial chronic pleuritis in pig. *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie* 128 (4), S. 314–318. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2010.00914.x.
- Stear MJ, Wakelin D (1998): Genetic resistance to parasitic infection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* (7 (1)), S. 143–153.
- Straw BE, Neubauer GD, Leman AD (1983): Factors affecting mortality in finishing pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183 (4), S. 452–455.
- Sun J, Williams J, Yan HC, Amin KM, Albelda SM, DeLisser HM (1996): Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *The Journal of biological chemistry* 271 (31), S. 18561–18570.
- Sweeney EJ (1968): *Escherichia coli* enteric disease of swine: Observation on herd resistance. *Irish Veterinary Journal* (22), S. 42–46.
- Switalski LM, Patti JM, Butcher W, Gristina AG, Speziale P, Höök M (1993): A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Molecular microbiology* 7 (1), S. 99–107.
- Tait SW, Reid EB, Greaves DR, Wileman TE, Powell PP (2000): Mechanism of inactivation of NF-kappa B by a viral homologue of I kappa b alpha. Signal-induced release of I kappa b alpha results in binding of the viral homologue to NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 275 (44), S. 34656–34664. DOI: 10.1074/jbc.M000320200.
- Thacker EL (2001): Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 17 (3), S. 551–565. DOI: 10.1016/s0749-0720(15)30006-2.
- Thevenon J, Ivoc M, Rozsnyay Z, Alapi I, Imre A, Tenk M (2014): Coglapix, an *Actinobacillus Pleuropneumoniae* inactivated vaccine induce high levels of anti-Apx and anti-capsular antibodies. *Proceedings of European Symposium of Porcine Health Management* (6), S. 245.
- Thomas DC, Haile RW, Duggan D (2005): Recent developments in genomewide association scans: a workshop summary and review. *American journal of human genetics* 77 (3), S. 337–345. DOI: 10.1086/432962.
- Tobias TJ, Klinkenberg D, Bouma A, van den Broek J, Daemen AJ J M, Wagenaar JA, Stegeman JA (2014): A cohort study on *Actinobacillus pleuropneumoniae* colonisation in suckling piglets. *Preventive veterinary medicine* 114 (3-4), S. 223–230. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2014.02.008.
- Topol EJ, Murray SS, Frazer KA (2007): The genomics gold rush. *JAMA* 298 (2), S. 218–221. DOI: 10.1001/jama.298.2.218.

Tuggle CK, Schmitz CB, Gingerich-Feil D (1997): Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (NRAMP1) cDNA. *Journal of animal science* 75 (1), S. 277. DOI: 10.2527/1997.751277x.

Tumamao JQ, Bowles RE, Bosch H, Klaasen H, Fenwick BW, Storie GJ, Blackall PJ (2004): Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. *Australian Vet J* 82 (6), S. 370–374. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2004.tb11108.x.

Utthe JJ, Wang Y, Qu L, Nettleton D, Tuggle CK, Bearson SM D (2009): Correlating blood immune parameters and a CCT7 genetic variant with the shedding of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in swine. *Veterinary Microbiology* 135 (3-4), S. 384–388. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.09.074.

van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J, Banks E, Garimella KV, Altshuler D, Gabriel S, DePristo MA (2013): From FastQ data to high confidence variant calls. The Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Current protocols in bioinformatics* 43, 11.10.1-33. DOI: 10.1002/0471250953.bi1110s43.

van Kuppevelt TH, Veerkamp JH, Timmermans JA (1995): Immunoquantification of type I, III, IV and V collagen in small samples of human lung parenchyma. *The international journal of biochemistry & cell biology* 27 (8), S. 775–782.

van Overbeke I, Chiers K, Charlier G, Vandenberghe I, van Beeumen J, Ducatelle R, Haesebrouck F (2002): Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 88 (1), S. 59–74.

van Overbeke I, Chiers K, Ducatelle R, Haesebrouck F (2001): Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 48 (1), S. 15–20.

Velthuis AG J, Jong MC M de, Kamp EM, Stockhofe N, Verheijden JH M (2003): Design and analysis of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* transmission experiment. *Preventive veterinary medicine* 60 (1), S. 53–68.

Vengust G, Valencak Z, Bidovec A (2006): A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 53 (1), S. 24–27. DOI: 10.1111/j.1439-0450.2006.00899.x.

Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, Skamene E, Olivier M, Jothy S, Gros P (1995): The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *The Journal of experimental medicine* 182 (3), S. 655–666. DOI: 10.1084/jem.182.3.655.

Vigre H, Angen Ø, Barfod K, Lavritsen DT, Sørensen V (2002): Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions. Emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies. *Veterinary Microbiology* 89 (2-3), S. 151–159. DOI: 10.1016/S0378-1135(02)00149-9.

Vigre H, Ersboll AK, Sørensen V (2003): Decay of Acquired Colostral Antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Pigs. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 50 (9), S. 430–435. DOI: 10.1046/j.0931-1793.2003.00700.x.

Vincent AL, Thacker BJ, Halbur PG, Rothschild MF, Thacker EL (2005): In vitro susceptibility of macrophages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus varies between genetically diverse lines of pigs. *Viral immunology* 18 (3), S. 506–512. DOI: 10.1089/vim.2005.18.506.

- Vincent AL, Thacker BJ, Halbur PG, Rothschild MF, Thacker EL (2006): An investigation of susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus between two genetically diverse commercial lines of pigs. *Journal of animal science* 84 (1), S. 49–57. DOI: 10.2527/2006.84149x.
- Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, Imsland F, Lear TL, Adelson DL, Bailey E, Bellone RR, Blöcker H, Distl O, Edgar RC, Garber M, Leeb T, Mauceli E, MacLeod JN, Penedo MC T, Raison JM, Sharpe T, Vogel J, Andersson L, Antczak DF, Biagi T, Binns MM, Chowdhary BP, Coleman SJ, Della Valle G, Fryc S, Guérin G, Hasegawa T, Hill EW, Jurka J, Kiialainen A, Lindgren G, Liu J, Magnani E, Mickelson JR, Murray J, Nergadze SG, Onofrio R, Pedroni S, Piras MF, Raudsepp T, Rocchi M, Røed KH, Ryder OA, Searle S, Skow L, Swinburne JE, Syvänen AC, Tozaki T, Valberg SJ, Vaudin M, White JR, Zody MC, Lander ES, Lindblad-Toh K (2009): Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science (New York, N.Y.)* 326 (5954), S. 865–867. DOI: 10.1126/science.1178158.
- Wakelin D (1979): Genetic Control of Susceptibility and Resistance to Parasitic Infection. In: W. H. R. Lumsden, Ralph Müller und John R. Baker (Hg.): *Advances in parasitology*, Bd. 16. London: Academic Press (Advances in Parasitology), S. 219–308.
- Wang Y, Qiu C, Cui Q (2015): A Large-Scale Analysis of the Relationship of Synonymous SNPs Changing MicroRNA Regulation with Functionality and Disease. Unter Mitarbeit von Yuchen Wang, Chengxiang Qiu und Qinghua Cui. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632712/>, zuletzt aktualisiert am 01.01.2015, zuletzt geprüft am 23.11.2018.
- Ward CK, Inzana TJ (1994): Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153 (5), S. 2110–2121.
- Warr A, Robert C, Hume D, Archibald AL, Deeb N, Watson M (2015): Identification of Low-Confidence Regions in the Pig Reference Genome (Sscrofa10.2). *Front. Genet.* 6, S. 338. DOI: 10.3389/fgene.2015.00338.
- Warr, Amanda; Affara, Nabeel; Aken, Bronwen; Beiki, H.; Bickhart, Derek M.; Billis, Konstantinos; Chow, William; Eory, Lel; Finlayson, Heather A.; Flicek, Paul; Girón, Carlos G.; Griffin, Darren K.; Hall, Richard; Hannum, Greg; Hourlier, Thibaut; Howe, Kerstin; Hume, David A.; Izuogu, Osagie; Kim, Kristi; Koren, Sergey; Liu, Haibou; Manchanda, Nancy; Martin, Fergal J.; Nonneman, Dan J.; O'Connor, Rebecca E.; Phillippy, Adam M.; Rohrer, Gary A.; Rosen, Benjamin D.; Rund, Laurie A.; Sargent, Carole A.; Schook, Lawrence B.; Schroeder, Steven G.; Schwartz, Ariel S.; Skinner, Ben M.; Talbot, Richard; Tseng, Elizabeth; Tuggle, Christopher K.; Watson, Mick; Smith, Timothy P. L.; Archibald, Alan L. (2019): An improved pig reference genome sequence to enable pig genetics and genomics research (1).
- Whitworth KM, Rowland RR R, Ewen CL, Tribble BR, Kerrigan MA, Cino-Ozuna AG, Samuel MS, Lightner JE, McLaren DG, Mileham AJ, Wells KD, Prather RS (2015): Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nature Biotechnology* 34, 20 EP -. DOI: 10.1038/nbt.3434.
- Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR (2005): A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American journal of human genetics* 76 (5), S. 887–893. DOI: 10.1086/429864.
- Xie Y, Muller WA (1993): Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (12), S. 5569–5573.

Xu Z, Zhou Y, Li L, Zhou R, Xiao S, Wan Y, Zhang S, Wang K, Li W, Li L, Jin H, Kang M, Dalai B, Li T, Liu L, Cheng Y, Zhang L, Xu T, Zheng H, Pu S, Wang B, Gu W, Zhang X-L, Zhu G-F, Wang S, Zhao G-P, Chen H (2008): Genome biology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 prevalent in China. *PLoS one* 3 (1), e1450. DOI: 10.1371/journal.pone.0001450.

Yang X, Cheng Y-T, Tan M-F, Zhang H-W, Liu W-Q, Zou G, Zhang L-S, Zhang C-Y, Deng S-M, Yu L, Hu X-Y, Li L, Zhou R, Bäumlér AJ (2015): Overexpression of Porcine Beta-Defensin 2 Enhances Resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infection in Pigs. *Infect. Immun.* 83 (7), S. 2836–2843. DOI: 10.1128/IAI.03101-14.

Yang X-Q, Chen Y-C, Wang L, Li H-T, Di Liu, Guan Q-Z, Fu B (2012): Functional analysis of SNPs in porcine TLR4 gene. *Yi chuan = Hereditas* 34 (8), S. 1050–1056.

Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Marugán JC, Cummins C, Davidson C, Dodiya K, Fatima R, Gall A, Giron CG, Gil L, Grego T, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Martinez JG, Maurel T, McDowall M, McMahon A, Mohanan S, Moore B, Nuhn M, Oheh DN, Parker A, Parton A, Patricio M, Sakthivel MP, Abdul Salam AI, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Sycheva M, Szuba M, Taylor K, Thormann A, Threadgold G, Vullo A, Walts B, Winterbottom A, Zadissa A, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Hunt SE, Ilesley G, Kostadima M, Langridge N, Loveland JE, Martin FJ, Morales J, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Trevanion SJ, Cunningham F, Howe KL, Zerbino DR, Flicek P (2020): Ensembl 2020. *Nucleic acids research* 48 (D1), D682-D688. DOI: 10.1093/nar/gkz966.

Zhang B, Ren J, Yan X, Huang X, Ji H, Peng Q, Zhang Z, Huang L (2008): Investigation of the porcine MUC13 gene: isolation, expression, polymorphisms and strong association with susceptibility to enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab/ac. *Animal genetics* 39 (3), S. 258–266. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2008.01721.x.

Zhang G, Wu H, Ross CR, Minton JE, Blecha F (2000): Cloning of Porcine NRAMP1 and Its Induction by Lipopolysaccharide, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interleukin-1 $\beta$ : Role of CD14 and Mitogen-Activated Protein Kinases†. *Infect. Immun.* 68 (3), S. 1086–1093.

Zhang Y, Zhang L, Wang L, Qiao L, Liang J, Yan H, Zhao K, Liu X, Wang L (2015): Identification and examination of a novel 9-bp insert/deletion polymorphism on porcine SFTPA1 exon 2 associated with acute lung injury using an oleic acid-acute lung injury model. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* 86 (6), S. 573–578. DOI: 10.1111/asj.12330.

Zhao S, Zhu M, Chen H (2012): Immunogenomics for identification of disease resistance genes in pigs. A review focusing on Gram-negative bacilli. *Journal of animal science and biotechnology* 3 (1), S. 34. DOI: 10.1186/2049-1891-3-34.

Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, Hanrahan F, Pertea G, van Tassel CP, Sonstegard TS, Marçais G, Roberts M, Subramanian P, Yorke JA, Salzberg SL (2009): A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome biology* 10 (4), R42. DOI: 10.1186/gb-2009-10-4-r42.

## 9 Anhang

### 9.1 Phänotypen

Nachfolgend sind die neben dem *Respiratory Health-Score* (RHS) innerhalb der phänotypisierten Tiere erhobenen Parameter *Klinik*, Pathologiescore (*Sektion/LLS*), Röntgenscore (*RoeS*), Sonographiescore (*SoS*) und Reisolationscore (*ReIsol*) gegenüber der Tierzahl abgebildet. Außerdem sind jeweils alle 163 phänotypisierten Tiere, 74 sequenzierte Tieren und die 58 Tiere dargestellt, mit denen die Assoziationsstudie ausgeführt wurde.

## 9.1.1 Klinik

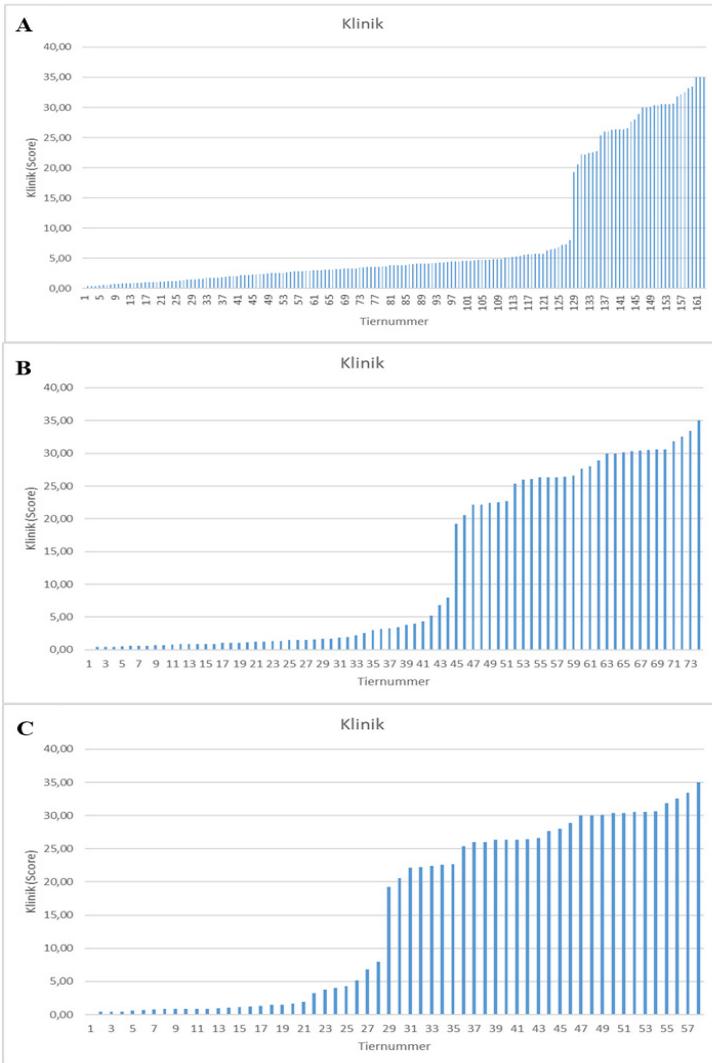


Abbildung 22 - Klinik-Werte graphisch dargestellt

Die Klinik-Werte sind auf der y-Achse gegen die Anzahl der Tiere auf der x-Achse aufgetragen. A zeigt alle 163 infizierten und phänotypisierten Tiere, B zeigt alle 74 sequenzierten Tiere und C zeigt die 58 für die Assoziationsstudie ausgewählten Tiere.

9.1.2 Sektion - Pathologiescore

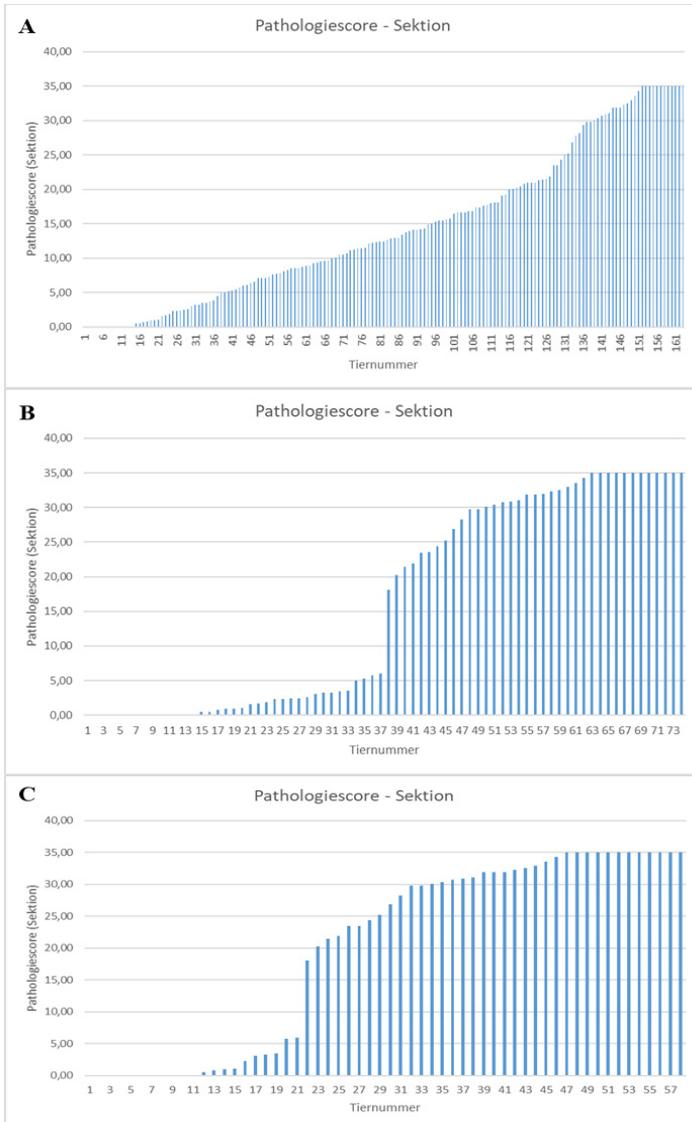


Abbildung 23 - Sektion-Werte graphisch dargestellt

Die Sektions-Werte sind auf der y-Achse gegen die Anzahl der Tiere auf der x-Achse aufgetragen. A zeigt alle 163 infizierten und phänotypisierten Tiere, B zeigt alle 74 sequenzierten Tiere und C zeigt die 58 für die Assoziationsstudie ausgewählten Tiere.

## 9.1.3 RoeS - Röntgenscore

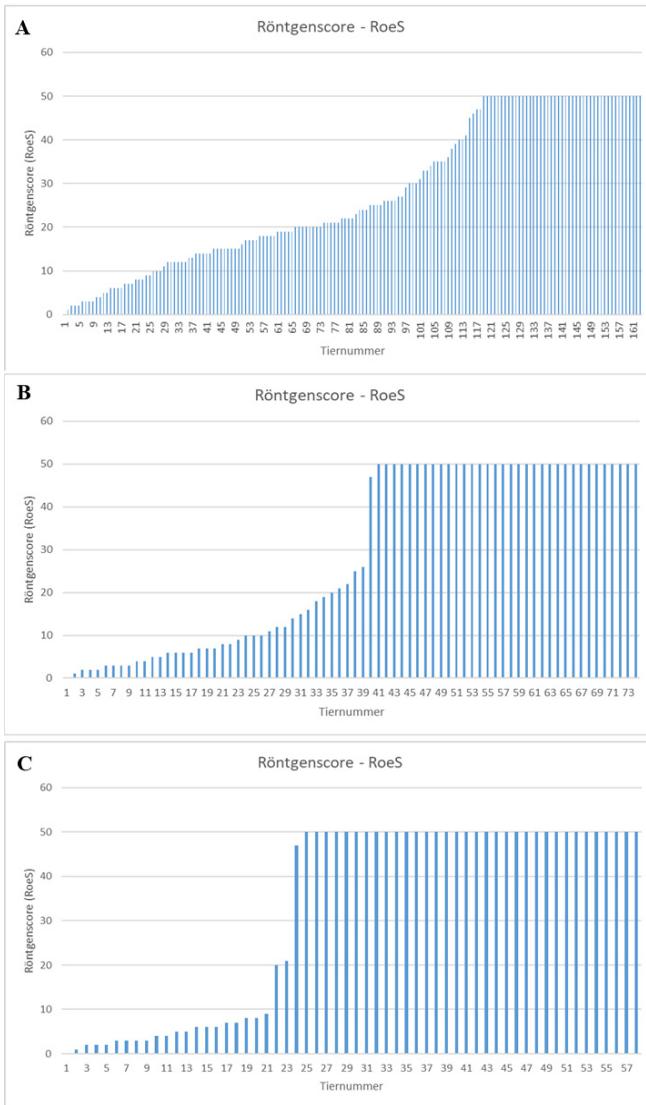


Abbildung 24 - RoeS-Werte graphisch dargestellt

Die RoeS-Werte sind auf der y-Achse gegen die Anzahl der Tiere auf der x-Achse aufgetragen. A zeigt alle 163 infizierten und phänotypisierten Tiere, B zeigt alle 74 sequenzierten Tiere und C zeigt die 58 für die Assoziationsstudie ausgewählten Tiere.

## 9.1.4 SoS - Sonographiescore

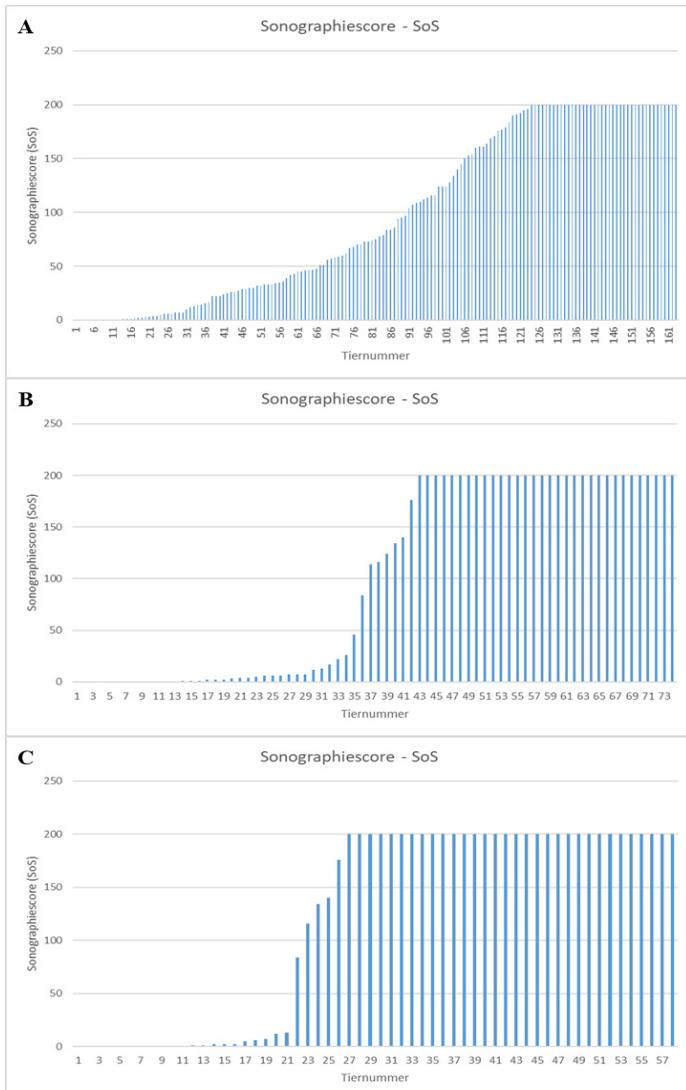


Abbildung 25 - SoS-Werte graphisch dargestellt

Die SoS-Werte sind auf der y-Achse gegen die Anzahl der Tiere auf der x-Achse aufgetragen. A zeigt alle 163 infizierten und phänotypisierten Tiere, B zeigt alle 74 sequenzierten Tiere und C zeigt die 58 für die Assoziationsstudie ausgewählten Tiere.

## 9.1.5 ReIsol - ReIsolationsscore

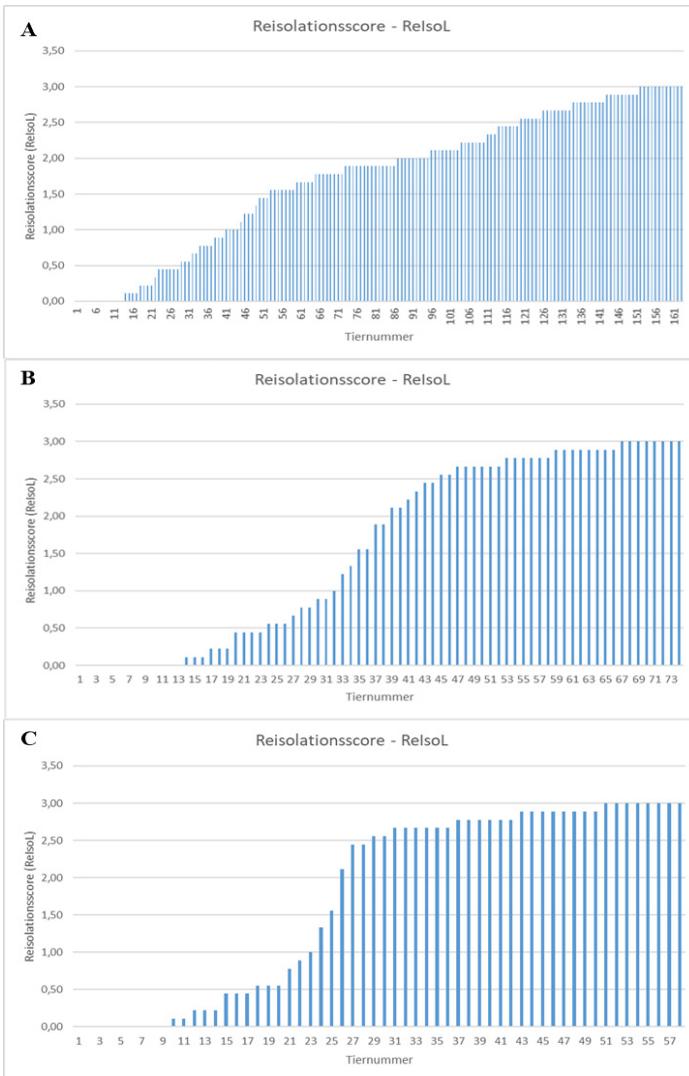


Abbildung 26 - ReIsol-Werte graphisch dargestellt

Die ReIsol-Werte sind auf der y-Achse gegen die Anzahl der Tiere auf der x-Achse aufgetragen. A zeigt alle 163 infizierten und phänotypisierten Tiere, B zeigt alle 74 sequenzierten Tiere und C zeigt die 58 für die Assoziationsstudie ausgewählten Tiere.

## 9.2 Abdeckung der einzelnen sequenzierten Tiere

Tabelle 18 - Abdeckung der 74 sequenzierten Tiere

Tiere	Gesamtzahl			Sequenzierte	
	der Reads	Mapped (%)	Duplikate (%)	Basen (Gb)	Abdeckung
PL017	96865251	94,41	1,57	11,23	3,87
PL021	81237190	94,79	1,51	9,51	3,28
PL022	104137611	94,59	1,54	12,16	4,19
PL023	94073054	94,59	1,5	10,99	3,79
PL025	87617643	94,7	1,07	10,3	3,55
PL026	80588262	94,69	1,28	9,44	3,25
PL027	99889023	94,54	1,48	11,66	4,02
PL028	247186685	94,7	1,9	28,82	9,93
PL033	245995332	95,01	1,57	28,87	9,95
PL036	89901020	94,64	1,12	10,58	3,65
PL037	90651650	95,01	1,34	10,62	3,66
PL039	115971902	94,88	1,49	13,59	4,68
PL040	117386663	94,62	1,6	13,67	4,71
PL041	81668877	94,67	1,02	9,59	3,3
PL048	111158880	94,91	1,6	13,02	4,49
PL049	249706983	94,78	1,73	29,18	10,06
PL050	103959051	95,02	1,46	12,23	4,21
PL051	91251554	95,1	1,39	10,74	3,7
PL052	235384471	94,64	1,8	27,46	9,46
PL054	116457005	94,73	1,4	13,64	4,7
PL055	97833322	94,43	1,54	11,38	3,92
PL056	82440172	94,86	1,5	9,66	3,33
PL058	113813548	94,54	1,51	13,26	4,57
PL059	95927448	94,69	1,53	11,19	3,86
PL063	84344671	94,87	1,41	9,86	3,4
PL064	94306867	94,89	1,32	11,07	3,81
PL066	94849281	94,71	1,4	11,08	3,82
PL069	92673483	94,73	1,4	10,82	3,73
PL070	86297543	94,68	1,22	10,11	3,48
PL101	124123709	94,93	1,54	14,53	5,01
PL103	115957979	94,65	1,6	13,56	4,67
PL104	87261494	94,48	1,5	10,15	3,5
PL106	90804216	94,46	1,5	10,58	3,64

Tabelle 18 - Abdeckung der 74 sequenzierten Tiere

Tiere	Gesamtzahl			Sequenzierte	
	der Reads	Mapped (%)	Duplikate (%)	Basen (Gb)	Abdeckung
PL107	85729632	94,63	1,61	10	3,45
PL114	94945862	94,62	1,47	11,12	3,83
PL115	92329139	94,56	1,51	10,77	3,71
PL116	112884891	94,6	1,53	13,14	4,53
PL119	88913444	94,52	1,36	10,4	3,58
PL125	84044184	94,5	1,47	9,78	3,37
PL126	96133190	94,6	1,55	11,21	3,86
PL127	98691897	94,54	1,45	11,52	3,97
PL129	102731854	94,55	1,55	11,97	4,13
PL130	94955201	94,62	1,54	11,05	3,81
PL131	100776407	94,61	1,73	11,74	4,04
PL132	108166791	94,57	1,59	12,6	4,34
PL135	142068550	94,42	1,35	16,61	5,72
PL136	104282253	94,67	1,67	12,22	4,21
PL138	86868421	94,95	0,97	10,25	3,53
PL139	84015164	94,59	1,6	9,82	3,38
PL141	94416363	94,94	1,55	11,07	3,81
PL143	90458978	94,55	1,47	10,56	3,64
PL145	111649110	94,65	1,72	13,01	4,48
PL146	89053294	94,63	1,65	10,4	3,58
PL150	97112889	94,81	1,58	11,37	3,92
PL158	104016171	94,63	1,68	12,13	4,18
PL160	98860354	94,98	1,54	11,61	4
PL162	86179564	94,4	1,58	10,02	3,45
PL163	103955721	94,96	1,55	12,2	4,21
PL164	86755394	94,49	1,44	10,1	3,48
PL165	117124925	94,88	1,55	13,71	4,72
PL172	129223842	94,97	1,59	15,1	5,2
PL177	122281107	94,62	1,61	14,28	4,92
PL178	114612895	95,06	1,59	13,44	4,63
PL182	114853319	94,73	1,57	13,4	4,62
PL194	110146209	94,71	1,62	12,89	4,44
PL197	110142531	94,68	1,59	12,86	4,43
PL198	111835454	94,66	1,5	13,08	4,51
PL201	114587701	94,67	1,65	13,36	4,6
PL202	114136795	95,01	1,58	13,42	4,63
PL204	109955100	94,72	1,63	12,85	4,43

Tabelle 18 - Abdeckung der 74 sequenzierten Tiere

Tiere	Gesamtzahl			Sequenzierte	
	der Reads	Mapped (%)	Duplikate (%)	Basen (Gb)	Abdeckung
PL205	114430571	94,65	1,63	13,35	4,6
PL207	140966078	95,01	1,07	16,64	5,73
PL210	130367129	95,05	1,08	15,41	5,31
PL211	139243012	95,05	1,11	16,41	5,66

Tabelle 18 zeigt die Gesamtzahl der durch das Next-Generation-Sequencing erstellten Reads, wie viel Prozent dieser Reads an das Referenzgenom angelegt werden konnten (Mapped [%]), die Anzahl der doppelt vorkommenden Reads (Duplikate [%]), die Gesamtzahl der sequenzierten Basen und die Abdeckung von jedem der 74 sequenzierten Tiere.

### 9.3 Manhattan-Plots

Nachfolgend sind die Manhattan-Plots und Quantile-Quantile-Plots bezogen auf die einzelnen gemessenen Phänotyp-Parameter aufgeführt (logarithmiert), die keine signifikanten Assoziationen gezeigt haben (Bonferroni- bzw. FDR-BH-korrigierte P-Werte  $>0,05$ ).

#### 9.3.1 Klinik - Klinikscore

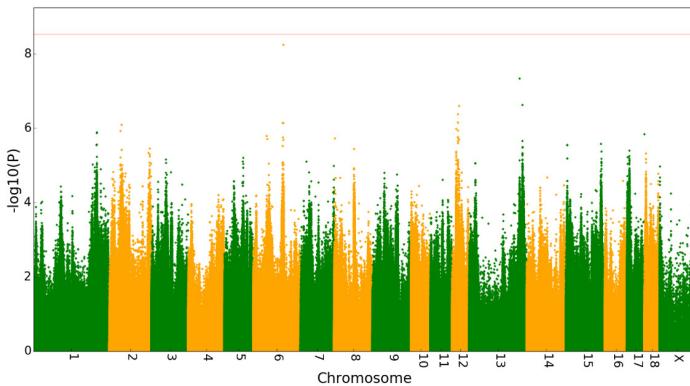


Abbildung 27 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp Klinik und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren.

Auf der x-Achse sind die Chromosomen und auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus des P-Wertes dargestellt.

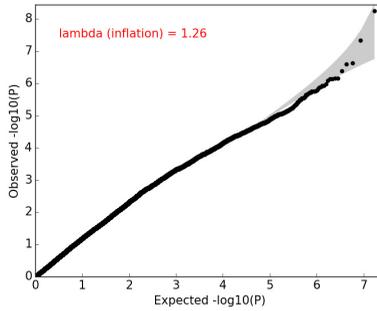


Abbildung 28 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des quantitativen Phänotyps Klinik und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere

Jeweils der erwartete und beobachtete negative dekadische Logarithmus des P-Wertes der einzelnen Varianten sind gegeneinander aufgetragen. Die genomische Inflation Lambda wird ebenfalls angezeigt.

## 9.3.2 Sektion - Sektionsscore

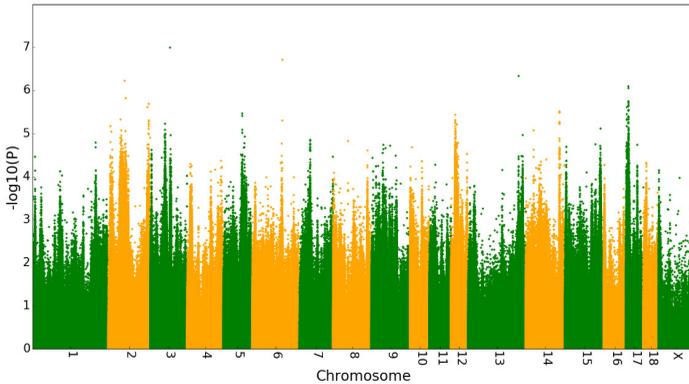


Abbildung 29 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp Sektion und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren.

Auf der x-Achse sind die Chromosomen und auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus des P-Wertes dargestellt.

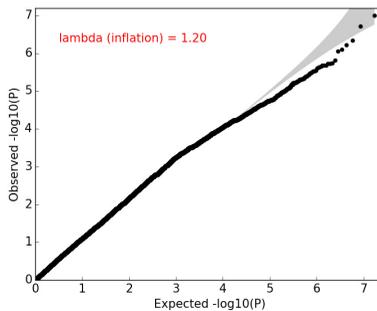


Abbildung 30 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des quantitativen Phänotyps Sektion und der exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere

Jeweils der erwartete und beobachtete negative dekadische Logarithmus des P-Wertes der einzelnen Varianten sind gegeneinander aufgetragen. Die genomische Inflation Lambda wird ebenfalls angezeigt.

## 9.3.3 RoeS - Röntgenscore

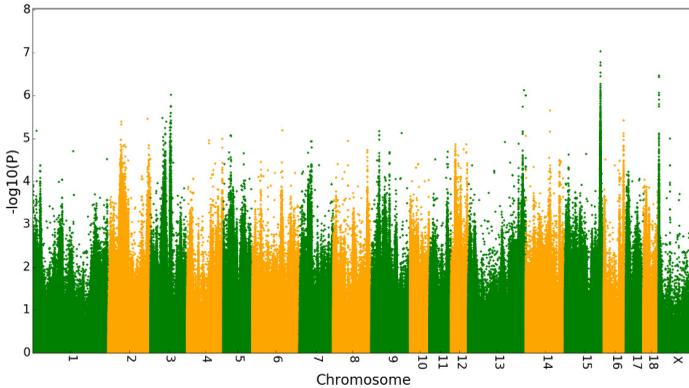


Abbildung 31 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp RoeS(Röntgenscore) und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren.

Auf der x-Achse sind die Chromosomen und auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus des P-Wertes dargestellt.

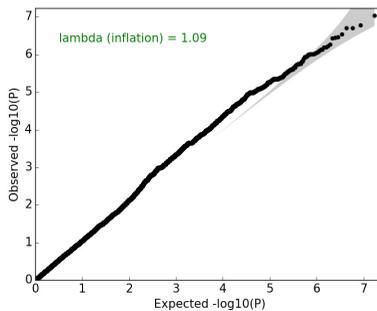


Abbildung 32 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) quantitativen Phänotyps RoeS und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere.

Jeweils der erwartete und beobachtete negative dekadische Logarithmus des P-Wertes der einzelnen Varianten sind gegeneinander aufgetragen. Die genomische Inflation Lambda wird ebenfalls angezeigt.

## 9.3.4 SoS - Sonographiescore

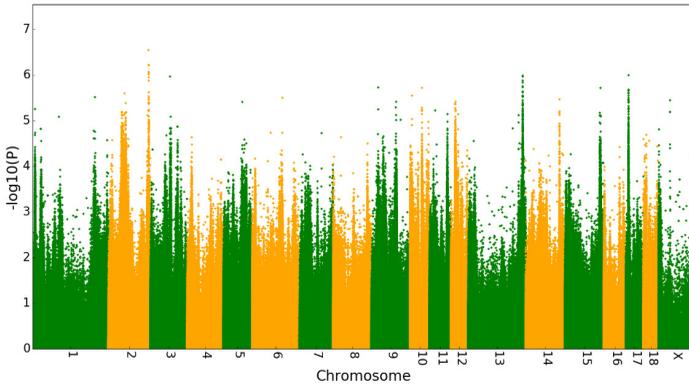


Abbildung 33 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp SoS (Sonographiescore) und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren.

Auf der x-Achse sind die Chromosomen und auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus des P-Wertes dargestellt.

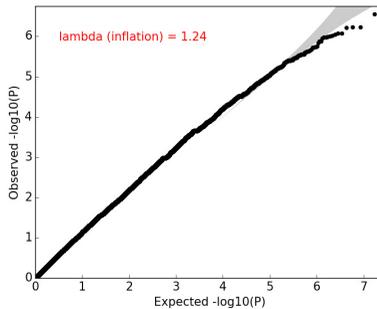


Abbildung 34 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des quantitativen Phänotyps SoS und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere.

Jeweils der erwartete und beobachtete negative dekadische Logarithmus des P-Wertes der einzelnen Varianten sind gegeneinander aufgetragen. Die genomische Inflation Lambda wird ebenfalls angezeigt.

## 9.3.5 RelsoL - Reisolationscore

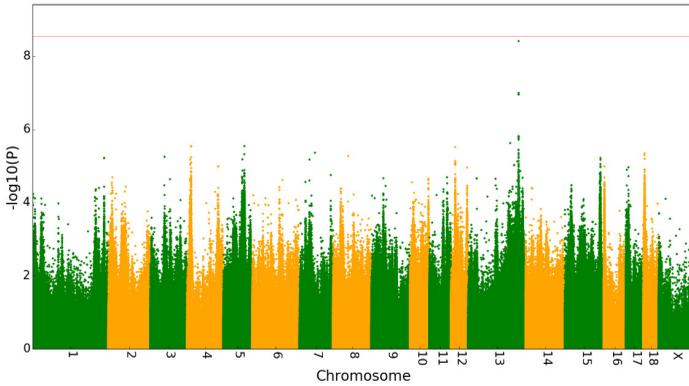


Abbildung 35 - Manhattan-Plot mit dem quantitativen Phänotyp RelsoL (Reisolationscore) und 37 resistenten Tieren gegenüber 37 empfindlichen Tieren.

Auf der x-Achse sind die Chromosomen und auf der y-Achse der negative dekadische Logarithmus des P-Wertes dargestellt.

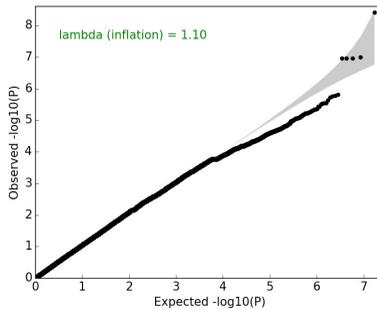


Abbildung 36 - Quantile-Quantile-Plot (Q-Q-Plot) des quantitativen Phänotyps RelsoL und des exakten Fisher-Tests der resistenten und empfindlichen Tiere.

Jeweils der erwartete und beobachtete negative dekadische Logarithmus des P-Wertes der einzelnen Varianten sind gegeneinander aufgetragen. Die genomische Inflation Lambda wird ebenfalls angezeigt.

## 9.4 Verwendete Primer

### 9.4.1 Sanger-Sequenzierung

Nachfolgend sind die für die Sanger-Sequenzierung verwendeten Primer aufgeführt.

*Tabelle 19 - Primer, die für die Varianten verwendet wurden, die mittels Sanger-Genotypisierung überprüft wurden.*

Variante	Forward-Primer	Reverse-Primer	Produktlänge (bp)	Annealing-Temperatur (°C)	GC-Gehalt Forward/Reverse(%)
2_45729907	GAAGCGTCAGTCCTCCAAC	CAGCTCTGGGAGTTCCTTTG	201	60	55/55
2_48481895	GCACTCAGTGGATGGGTAT	TGCAATGGGAAAAAGGACTC	244	60,1	55/45
12_14641621	GTA CTGCAAATGCAGCCAAA	AAGAATGCACATTTCTTTCAAAT	490	59,9	45/25
15_128373275	AGCACTGGAGTCCCTTG	TGGTACTAAGCGCCACTGAA	215	60,3	55/50
15_128471464	TGCTTATCAGTAGTGGTGCCTTA	ACCCAGTAGTTGGGGATCT	499	59,7	43,5/55
15_128656271	AACGCCATAAAATGGAATGC	GAAGAGACAAAGACTTGCAAGAGA	240	59,8	40/41,7
2_45022788	CCACTTCAAATCCGTCCCA	AGCTCTCACTTTCTGCCAC	564	60	55/55
12_14645074	CAGCAACACAGGATCTGAGC	GAAATGCAGCATCGATGTAAAA	223	60,1	55/36,4
15_128600706	CTGTCTCCCAGGATAACCA	AAGTTCAGGCTGGCACTTG	249	59,9	55/52,6
15_128656271	AGAGTCTTGGTGCCTTCA	GAAGAGACAAAGACTTGCAAGAGA	290	60,1	50/41,7

### 9.4.2 KASP-Genotypisierung

Nachfolgend sind die Assays für die KASP-Genotypisierung aufgeführt. Die Bedingungen für die KASP-Genotypisierung entsprechen den bereits im Material- und Methoden-Teil aufgeführten Bedingungen, dargestellt in Tabelle 14.

*Tabelle 20 - Sequenzen und markierte Allele der Varianten, die mittels KASP-Genotypisierung überprüft wurden.*

Variante	FAM Allel	HEX Allel	Sequenz	Primer GC% Allel X	Primer GC% Allel Y	Primer GC%
15_128373275	G	T	CTGKTGTGCAATRTTT[G/T]ATCCCTGACCAGAGA	52,2	47,8	44,2
15_128446992	A	G	GAAAAGTGGATCCTC[A/G]CTTTCCTTAGGTAAW	47,8	54,5	59,1
15_128432657		CAC	TGTRTGTGTRTGTG[CAC]GTTCAKCCAGTCCAA	48,1	50	52,1
15_128476618	A	T	TCCCAACAAATCCAT[A/T]TGTGTAGCATTTGCT	37	37	42,6
15_128474183	C		TATGCGGAMTATGAA[C]/CCCCCCCCCAACA	77,8	72,2	52,1
15_128474702	G	T	GGTTTTGTTTGGTTT[G/T]GTTTCITTTCTATTT	24,2	21,2	37,9
2_46394508	T	C	CMTTCAATTCCTCTA[T/C]CTAGCATGCCACTCT	54,5	57,1	52,1
2_46394689	A	G	CTGCCAYTCACTAGC[A/G]TTTTRTGATCTTCACA	48,1	50	42,6

## 9.5 Prinzipalkomponentenanalyse der eingesetzten Tiere

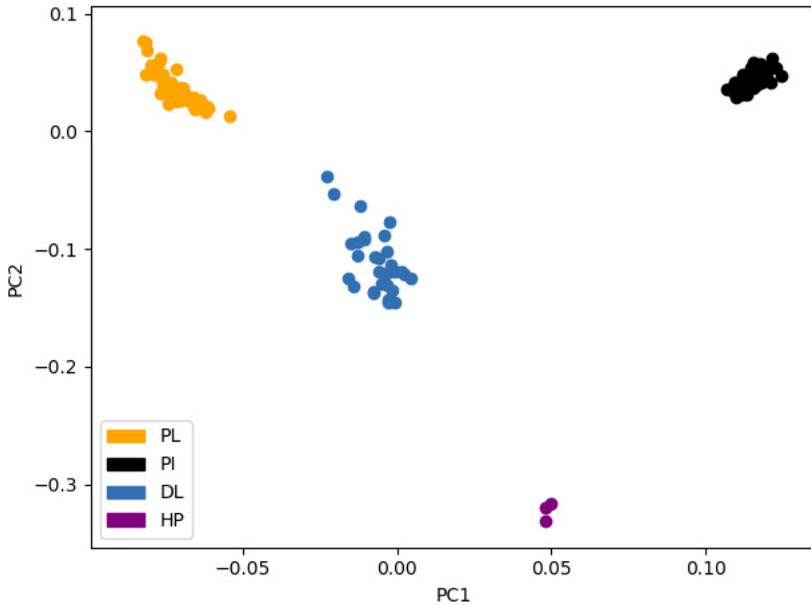


Abbildung 37 - Prinzipalkomponentenanalyse der eingesetzten Tiere

Dargestellt sind hierbei zwei Prinzipalkomponenten von Landrasse-Tieren, die von uns phänotypisiert wurden (PL), Landrasse-Tieren, die zur Schätzung (Imputation) der fehlenden Genotypen verwendet wurden (DL) sowie einer Piétrain-Population (PI) und einer Hampshire-Population (HP).

## 9.6 Python-Skripte

## 9.6.1 Skript, um aus Dateien im Variant-Call-Format (.vcf) in das Programm Plink einzulesen

```

import string, os
number = sys.argv[1]
chrs = range(1, 20)
files = []
for chr in chrs:
    file = "chr%s.raw.vcf.gz" % (chr)
    files.append(file)

files.append('chrX.raw.vcf.gz')
files.append('chrXY.raw.vcf.gz')

for file in files:
    chr = string.split(file, '.') [0]
    cmd = "plink --chr-set 19 --vcf %s --keep-allele-order --set-missing-var-ids @_# \
--const-fid --missing-phenotype 9999 --make-bed --out %s" % (file, chr)
    print cmd
    os.system(cmd)

#for file in files:
#    # chr = string.split(file, '.') [0]
#    # cmd = "plink --chr-set 19 --bfile %s --keep-allele-order --recode 01 transpose --output-missing-
#genotype . --out %s_PleuroRes" % (chr, chr)
#    # print cmd
#    # os.system(cmd)

#clean plink files separated by chromosome
for file in files:
    chr = string.split(file, '.') [0]
    cmd = "plink --chr-set 19 --bfile %s --allow-no-sex --geno 0.1 --maf 0.01 --hwe 0.0001 --make-bed --
out %s.cleaned" % (chr, chr)
    print cmd
    os.system(cmd)

cmd = "python merge_plink_files.py"
print cmd
os.system(cmd)

cmd = "plink --chr-set 19 --bfile %s --merge merge_plink_all_test.txt --make-bed --out
PleuroRes" %

```

9.6.2 Skript um aus Assoziationsdateien (.assoc) erstellt durch das Programm Plink  
Manhattanplots zu erstellen

```
#!/usr/bin/env python
# coding: latin-1
import string
import matplotlib.pyplot as plt
import numpy as np
from itertools import cycle
import pandas as pd
import sys

#prefix = sys.argv[1]
#trait = 'BH3'
#file = "%s.%s.mlma" % (prefix, trait)
file = sys.argv[1]

ps = pd.read_csv(file, delim_whitespace = True)
ps = ps.sort(['CHR', 'BP'])
chrs = set(list(ps['CHR']))

BP_base = 0
colors = cycle(['green', 'orange'])
chr_ticks = []
bonf = -np.log10(0.05/ps.shape[0])

plt.figure(figsize=(20,10))

#erstellen der x-Achsen makierungen und eines Scatterplots
for chr in chrs:
    col = colors.next()
```

```

BPO = ps[ps['CHR'] == chr].BP
BP = ps[ps['CHR'] == chr].BP + BP_base #durchgehende Skalierung für den Plot
P = -np.log10(ps[ps['CHR'] == chr].P)
chr_tick = ((max(BP) - BP_base)/2) + BP_base
chr_ticks.append(chr_tick)

plt.scatter(BP[P<bonf],P[P<bonf], s=10, marker='D', alpha=1, color=col,
edgecolors='none')#s=40

plt.scatter(BP[P>=bonf],P[P>=bonf], s=10, marker='D',alpha=1, color='red',
edgecolors='none')#s=40

BP_base = max(BP)

print ps[-np.log10(ps.P) >= bonf]

CHRS = ["%s" % int(chr) for chr in list(chrs)[:1]]
CHRS.append('X')

plt.xticks(chr_ticks, CHRS, rotation=-90)
ax = plt.gca()
ax.axhline(y=bonf, xmin=0, xmax=3, c='red', linewidth=0.5, zorder=0)
ax.axhline(y=-np.log10(1.004e-06), xmin=0, xmax=3, c='green', linewidth=0.5, zorder=0)
ax.xaxis.set_ticks_position('bottom')
ax.yaxis.set_ticks_position('left')
ax.tick_params(labelsize =20)
plt.xlabel('Chromosome', fontsize=24)
plt.ylabel('-log10(P)', fontsize=24)

plt.xlim((0, BP_base))
plt.ylim((0,max(-np.log10(ps['P'])+1)))

plt.title(trait, fontsize=18)
plt.show(block=False)

```

9.6.3 Skript um aus Assoziationsdateien (.assoc) erstellt durch das Programm Plink qq-Plots zu erstellen

```
#!/usr/bin/env python

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import matplotlib
import scipy.stats as stats
import pandas as pd
import sys

#requires rpy!
from rpy2.objects.packages import importr
r_stats = importr('stats')

prefix = sys.argv[1]
#trait = sys.argv[2]
#assoc_type = sys.argv[3]
file = "%s" % (prefix)

#file = 'fv.FIT.mlma'
#trait = 'FIT'
ps = pd.read_csv(file, delim_whitespace=True)

N = ps.shape[0]
P = ps['P']
p_median = np.median(P)
P = -np.log10(P)

P.sort_values(inplace=True)
```

```
chi = stats.chi2.ppf(1-p_median,1)
lambda_g = chi/0.456
print lambda_g

x = np.arange(1,N+1,dtype=float)
exp = -np.log10(x/N)

#a = np.arange(1,N+1)
#b = -np.arange(1,N+1)
#b.sort()
#b = -b
#c05 = -np.log10(stats.beta.ppf(.05, a.T, b.T))
#c95 = -np.log10(stats.beta.ppf(.95, a.T, b.T))

c05 = [r_stats.qbeta(0.05,i,N-i+1)[0] for i in range(1,N+1)]
c95 = [r_stats.qbeta(0.95,i,N-i+1)[0] for i in range(1,N+1)]
c05 = -np.log10(np.array(c05))
c95 = -np.log10(np.array(c95))

exp = np.array(exp)
exp.sort()
c05.sort()
c95.sort()

xc = np.linspace(min(exp), max(exp), len(c95))
plt.fill_between(exp, c95,c05, facecolor='0.8', edgecolor='white')
plt.scatter(exp,P,color='k')
plt.xlabel('Expected -log10(P)', fontsize=15)
plt.ylabel('Observed -log10(P)', fontsize=15)
ax = plt.gca()
```

```
ax.xaxis.set_ticks_position('bottom')
ax.yaxis.set_ticks_position('left')
ax.tick_params(labelsize =15)
plt.xlim((0,max(exp)+0.2))
plt.ylim((0,max(P)+0.2))
if lambda_g > 1.1:
    plt.text(0.5, max(P)-(0.1*max(P)), 'lambda (inflation) = %3.2f' % (lambda_g), color='red',
    fontsize = 15)
else:
    plt.text(0.5, max(P)-(0.1*max(P)), 'lambda (inflation) = %3.2f' % (lambda_g), color='green',
    fontsize = 15)

#plt.title(trait, fontsize=18)

plt.show()
```

## Danksagung

Nachfolgend möchte ich alle Personen erwähnen, die mich während der Zeit, in der die hier vorliegende Arbeit entstanden ist, auf vielfältige Weise unterstützt haben.

Der größte Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner, der mir zugetraut hat, dieses komplexe Thema zu be- und erarbeiten, und der immer an mich geglaubt und mich motiviert hat - nicht zuletzt auch mit der herausragenden Hilfe von Prof. Dr. habil. Hermann Willems im Labor mit seiner nicht zu erschöpfenden Geduld. Vielen Dank an euch beide!

Ein herzliches Dankeschön auch an alle Mitarbeiter, Mitdoktoranden und Kollegen aus der Schweineklinik und dem Labor.

Vielen Dank an alle im Projekt PleuroRes beteiligten Projektpartner, besonders an Prof. Dr. Hans Rudolf Fries, ohne den im Bereich des NGS wirklich nichts möglich gewesen wäre, und an PD Dr. habil. Doris Höltig, ohne die die Phänotypisierung nicht realisierbar gewesen wäre.

Auch meinen Eltern und meinem Bruder Philipp möchte ich für ihre unermüdliche Unterstützung danken. Besonders auf meinen Bruder konnte ich mit seiner fachlichen Expertise stets zählen. Vielen Dank, Bruderherz!

Nicht zuletzt möchte ich auch noch meiner Partnerin Janina danken, die mich heile durch meine Promotionszeit getragen hat, mir Mut zugesprochen hat und mich auch in schwierigen Zeiten ausgehalten hat.

## **Erklärung**

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

Florian Georg Nietfeld



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



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

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

ISBN: 978-3-8359-6916-2



9 17 8 3 8 3 5 11 9 6 9 1 6 2