

**Untersuchungen zur GOT1 als
Kandidatengen für die Variabilität der
Serum-Aspartat-Aminotransferase-Spiegel
beim Schwein**

Nina Clemens

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2010

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

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Wiederkäuer und Schweine
(Innere Medizin und Chirurgie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Untersuchungen zur *GOT1* als Kandidatengen für die Variabilität der Serum-Aspartat-Aminotransferase-Spiegel beim Schwein

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

eingereicht von

Nina Maria Clemens

Tierärztin aus Bottrop

Gießen 2010

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

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner
Prof. Dr. Georg Erhardt

Tag der Disputation: 26.10.2010

Meinen Eltern

Teile dieser Dissertation wurden vorab publiziert:

- Reiner, G., Clemens, N., Fischer, R., Köhler, F., Berge, T., Hepp, S., Willems, H., 2009:
Mapping of quantitative trait loci for clinical-chemical traits in swine. *Anim.Genet.* 2009
40, 57-64
- Reiner, G., Clemens, N., Lohner, E., Willems, H., 2010: SNPs in the porcine GOT1 gene
improve a QTL for serum aspartate aminotransferase activity (sAST) on SSC14. *Anim.
Genet.* 2010, 41(3): 319-323

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Genetik in der Gesundheitsprophylaxe beim Schwein	3
2.2 Gesundheitsassoziierte Genvarianten	4
2.2.1 Stand beim Nutztier	4
2.2.2 Stand beim Schwein	5
2.2.2.1 Infektionskrankheiten	5
2.2.2.2 Konstitutionelle Aberrationen	7
2.2.2.3 QTL beim Schwein mit Assoziation zu konstitutionellen Aberrationen und Empfindlichkeiten gegenüber Infektionskrankheiten	7
2.2.2.3.1 Sarcocystis miescheriana	8
2.3 Genomische Selektion und SNP-Chip Technologie	9
2.4 Etablierung gesundheitsbestimmender Genvarianten mittels Genomanalyse	10
2.4.1 QTL-Analyse	11
2.4.1.1 QTL für klinisch-chemische Merkmale als Gesundheits- und Resistenz definierenden genetischen Faktoren	13
2.5 AST	13
2.5.1 Rolle im Stoffwechsel	13
2.5.2 Aufbau des GOT1-Gens	16
2.5.3 Bedeutung von AST in der klinischen Diagnostik	18
2.5.4 Referenzwerte	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Versuchstiere	20
3.1.1 F ₂ -Schweinepopulation	20
3.1.2 Kommerzielle Schweinepopulation	21
3.2 Material	21

3.2.1	Geräte und Labormaterialien	21
3.2.2	Chemikalien und Enzyme	22
3.2.3	Lösungen und Puffer	22
3.2.4	Computerprogramme und Datenbanken	23
3.3	Methoden	24
3.3.1	Datenbankrecherche	24
3.3.2	Primerdesign	25
3.3.3	Konzentrationsbestimmung der Primer mittels Photometrie	26
3.3.4	DNA-Extraktion	27
3.3.5	Amplifikation spezifischer Sequenzen	27
3.3.5.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
3.3.6	Agarosegelelektrophorese	28
3.3.7	Vorbereitung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung	29
3.3.8	Sequenzierung von Amplifikaten der F ₀ -Tiere	29
3.3.9	Identifizierung von SNPs	29
3.3.10	Primerdesign für die Pyrosequenzierung	30
3.3.11	PCR-Amplifikation für die Pyrosequenzierung	31
3.3.12	Pyrosequenzierung	31
3.4	Phänotypen	32
3.4.1	Blutentnahme	32
3.4.2	Serumgewinnung	32
3.4.3	Bestimmung der Serum-AST-Werte	33
3.5	Statistische Auswertung	33
3.6	Kartierung der <i>GOT1</i>	33
3.7	QTL-Analyse	33
4	Ergebnisse	35
4.1	Sequenzen von <i>GOT1</i> in silico/ in vitro	35
4.2	Alignement von <i>GOT1</i> Sequenzen der Rassen Pietrain und Meishan	37
4.2.1	Promotor	37
4.2.2	Exon	41
4.3	Darstellung der SNPs	41
4.4	Genotypen in der F ₂ - und F ₀ -Generation	44
4.5	Assoziation zwischen Phänotyp und SNP in der F ₂ -Generation	45

4.6	Kartierung der <i>GOT1</i> auf SSC 14	48
4.7	QTL-Analyse	48
4.8	Auswahl der SNPs für die kommerzielle Population	52
4.9	Genotypen in der kommerziellen Population	52
4.10	Assoziation zwischen Phänotyp (AST-Wert) und <i>GOT1</i> -Genotyp in der kommerziellen Population	53
5	Diskussion	55
5.1	AST als Gesundheitsparameter	55
5.2	Gensequenz der <i>GOT1</i> beim Schwein	56
5.3	SNPs	57
5.4	QTL-Analyse	57
5.5	Assoziationsstudien	58
6	Zusammenfassung	60
7	Summary	62
8	Literaturverzeichnis	63
9	Anhang	77
10	Erklärung	84
11	Danksagung	85

Abkürzungsverzeichnis

Abb., Abbildung
A, Adenosin
AST, Aspartat-Aminotransferase
BAC, Bacterial Artificial Chromosome
bp, Basenpaare
bzw., beziehungsweise
CK, Kreatinkinase
C, Cytosin
DFD, dark, firm and dry meat
d.h., das heißt
DNA, Desoxyribonukleinsäure
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure
Fa., Firma
F₁, 1. Filialgeneration
F₂, 2. Filialgeneration
µl, Mikroliter
G, Guanin
GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
IU, International Unit
ml, Milliliter
min, Minute
NAD, Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
Nr., Nummer
n.s., nicht signifikant
PCR, Polymerase chain reaction
p.i., post infectionem
PSE, pale soft exudative
QTL, quantitative trait loci
QTN, quantitative trait nucleotide
RNA, Ribonucleinsäure
s, Sekunde
sAST, Serum-AST
SD, Standardabweichung
SNP, Single nucleotid polymorphism
SSC, sus scrofa
Tab., Tabelle
TE, Tris EDTA
T, Thymin
www, world wide web
z.B., zum Beispiel

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: Referenzblutwerte	S.19
Tab. 2: Tierzahlen und Aufbau der F ₂ -Familie	S. 21
Tab. 3: Optimierte PCR-Primer	S. 26
Tab. 4: Zusammensetzung des 25 µl PCR Reaktionsansatzes	S. 28
Tab. 5: PCR-Programm	S. 28
Tab. 6: Primer für die Pyrosequenzierung	S. 30
Tab. 7: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes für die Pyrosequenzierung	S. 31
Tab. 8: SNP-Basenaustausch	S. 43
Tab. 9: Aminosäuresequenz	S. 44
Tab. 10: SNP-Genotypen	S. 45
Tab. 11: Assoziation zwischen AST und SNP 1 bis 9	S. 46
Tab. 12: QTL sortiert nach Tag der AST-Wert Messung und SNP	S. 49
Tab. 13: Allelübereinstimmungen zwischen den SNPs (Pearsson Korrelationen)	S. 52
Tab. 14: SNP1 Genotypen der kommerziellen Population	S. 52
Tab. 15: Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp der kommerziellen Population	S. 53
Tab. 16: Tierverteilung in der kommerziellen Population	S. 54

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Rolle der AST in der Gluconeogenese	S. 14
Abb. 2: Malat-Aspartat-Shuttle	S. 15
Abb. 3: Struktur der zytoplasmatischen GOT (Bändermodell)	S. 16
Abb. 4: SNP-Lokalisation	S. 42
Abb. 5: Mittelwertsunterschiede und Standardabweichungen der logarithmierten AST-Werte an Tag 0	S. 47
Abb. 6: Mittelwertsunterschiede und Standardabweichungen der logarithmierten AST-Werte an Tag 14	S. 48
Abb. 7: QTL auf Basis der flankierenden Mikrosatelliten bei gesunden Individuen (Tag 0)	S. 50
Abb. 8: QTL auf Basis der flankierenden Mikrosatelliten unter akuter Belastung durch <i>S. miescheriana</i>	S. 51
Abb. 9: Mittelwerte, Standardabweichungen und Konfidenzintervall der AST-Werte nach SNP1 in der kommerziellen Population	S. 53

Schemataübersicht

Schema 1: <i>GOT1</i> -mRNA, Exon 1 bis 8 (GenBank Acc.No. M24088)	S. 35
Schema 2: <i>GOT1</i> -Promotorsequenz aus BAC CH242-276N12	S. 36
Schema 3: Alignment der Meishan- und Pietrain- Promotor-Sequenzen von <i>GOT1</i>	S. 37
Schema 4: Alignment der Exon 2-Sequenzen, F ₀ -Tiere, Forward-Primer	S. 41
Schema 5: Alignment der Exon 2-Sequenzen, F ₀ -Tiere, Reverse-Primer	S. 41
Schema 6: Aminosäuresequenz von <i>GOT1</i>	S. 43

1. Einleitung

Die klinische Chemie ist von großer Bedeutung für die Beurteilung der Schweinegesundheit im Rahmen von Einzeltieruntersuchungen und der Bestandsbetreuung. Sie liefert dem bestandsbetreuenden Tierarzt Informationen, die die Grundlage seiner Behandlung darstellen. Allerdings treten im Zusammenhang mit der Beurteilung von Ergebnissen der klinisch-chemischen Untersuchungen zahlreiche Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht, Fütterung oder Haltung auf, die eine Interpretation der Werte erheblich erschweren können. Auch der Genetik kommt hierbei in Form von Unterschieden zwischen Rassen und Populationen eine gewichtige Rolle zu (Heinritzi 2001). Der Untersucher muss davon ausgehen, dass in den Schweinepopulationen unterschiedliche Genvarianten vorhanden sind, die sich hemmend oder fördernd auf die klinisch-chemischen Parameter, so auch auf die Serum-Aktivität der Aspartat-Amino-Transferase (AST) auswirken können. Solche Varianten könnten sowohl außerhalb des *GOT1*-Gens (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase 1; syn. AST) als auch innerhalb des *GOT1*-Gens lokalisiert sein. Varianten außerhalb der *GOT1* könnten sich entweder direkt (Regulation) oder indirekt (Beeinflussung der Membranstabilität der Muskel- oder Leberzellen, etc.) an der Variabilität der Serum AST Werte beteiligen; aber auch Varianten im *GOT1*-Gen selbst wären als Ursache qualitativer (Exonbereich) oder quantitativer (Promotorbereich, untranslatierte Bereiche) Variation des Genprodukts denkbar. Über die molekularen Ursachen dieser Variabilität ist allerdings wenig bekannt. Bei anderen Tierarten wie Maus, Ratte und Rind sowie beim Mensch liegen keine Untersuchungen zur phänotypischen Variabilität der AST aufgrund genetischer Variation vor. Erste Hinweise auf eine mögliche Bedeutung der *GOT1* für die Variation der Serum AST (sAST) ergaben sich aus einem im Rahmen von Vorversuchen kartierten QTL (Quantitative Trait Locus) für sAST auf Chromosom 14 des Schweins (SSC14). Je nach Lokalisation und Funktion der entsprechenden Genvariante können höhere sAST Werte als ungünstiger (Membranstabilität) oder sogar als günstiger (physiologische Rolle der AST im Stoffwechsel) eingestuft werden. Die Kenntnis der dieser Variabilität zugrundeliegenden Genvarianten und ihrer Wirkungsweise würde es erlauben, Schweine mit effizienterem Stoffwechsel zu selektieren und die diagnostische Aussagekraft der sAST zu präzisieren. Beide Aspekte könnten zur Verbesserung der Schweinegesundheit beitragen.

Die vorliegende Arbeit verfolgt daher im Wesentlichen zwei Ziele:

1. Die molekulare Charakterisierung der GOT1 beim Schwein im Hinblick auf Zusammenhänge mit der Variabilität der Serum-AST-Aktivität.
2. Die Eingrenzung eines QTL für sAST durch Kandidatengenanalyse unter Berücksichtigung der *GOT1* als Kandidatengen.

Diese Ziele sollen mit folgendem Arbeitsprogramm schrittweise erreicht werden:

- a) Bereitstellung der molekularen Grundlagen zum Studium der *GOT1* (zytoplasmatische AST) beim Schwein.
- b) Ermittlung der genetischen Variabilität im *GOT1* Gen durch vergleichende Sequenzanalyse.
- c) Etablierung von SNPs im *GOT1* Gen als Voraussetzung für genetische und Assoziationsstudien.
- d) Untersuchung des Zusammenhangs zwischen *GOT1* SNPs und der Variabilität der sAST mit Hilfe von QTL- und Assoziationsstudien.
- e) Überprüfung des Einflusses der etablierten *GOT1*-SNPs auf den sAST-QTL auf SSC14.

2. Literaturübersicht

2.1 Genetik in der Gesundheitsprophylaxe beim Schwein

Für die Gesunderhaltung von Schweinebeständen wird in Zukunft die Prophylaxe einen immer größeren Raum einnehmen, denn der Konsument verlangt sichere Lebensmittel aus einer Produktion mit minimalem Medikamenteneinsatz, die frei von Krankheitserregern sind (Reiner et al., 2002). Hieran orientiert sich die Akzeptanz des Verbrauchers für Produkte tierischer Herkunft. Der Landwirt hat bei der Produktion der Schweine das Ziel, die ökonomischen Verluste in Form von Tierverlusten, Leistungsminderung, Mehrarbeit sowie Kosten für Prophylaxemaßnahmen und Therapie zu minimieren. Gesundere Schweine haben eine bessere Futtermittelverwertung und belasten die Umwelt weniger durch ihre Emissionen. Außerdem verlangt das Berufsethos von Tierärzten und Landwirten Leiden, Schäden und Schmerzen bei Tieren zu vermeiden. Es müssen alle Möglichkeiten ausgeschöpft werden, um Schweine zu produzieren, die frei sind von Krankheiten. Bislang konnte genetische Krankheitsresistenz nur wenig in die Züchtung des Schweins integriert werden, obwohl ein genetischer Zusammenhang in zahlreichen Rassen und Populationen besteht (Reiner, 2003). Die geringe Umsetzungsrate liegt zum Teil an der Schwierigkeit, Träger günstiger Anlagen zu erkennen. Die Identifikation wird durch dominierende Umwelteffekte wie Haltung, Hygiene- und Impfstatus der Betriebe erschwert. Allerdings sind in den letzten Jahren Anstrengungen zu erkennen, Genvarianten mit Assoziation zu gesundheitsbestimmenden Merkmalen zu identifizieren (Hospital et al., 1992). Das Ziel der Tierzüchtung liegt dabei in der simultanen Detektion möglichst aller gesundheitsbestimmenden Genvarianten (Meuwissen & van Arendonk, 1992). Die Umsetzung soll mit Hilfe der DNA-Chip Technologie gelingen. Aktuell basieren diese SNP-Chips meist auf anonymen Markern, die noch keine hundertprozentige Kopplung mit dem Gesundheitsparameter aufweisen, weil die funktionelle Genvariante meist noch nicht bekannt ist. Kopplungsunterschiede zwischen Populationen sind somit möglich und können jederzeit neu entstehen. Ein aktuelles Ziel für die Zukunft ist daher, die anonymen Marker durch funktionelle Marker zu ersetzen. Dazu muss jede gesundheitsbestimmende Genvariante individuell auf ihre Assoziation geprüft werden. Die Suche nach gesundheitsorientierten Markern wird international in der Forschung vorangetrieben (Kaminski et al., 2005, 2008; Ibeagha-Awemu et al., 2008). Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur Etablierung eines Markers in einem gesundheitsassoziierten Kandidatengen, der Glutamat Oxalacetat Transaminase 1 (*GOT1*), dar.

2.2 Gesundheitsassoziierte Genvarianten

Um molekulargenetische Hintergründe wichtiger Funktionen des tierischen Organismus zu entschlüsseln ist unter anderem vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) der Förderschwerpunkt "Funktionelle Genomanalyse tierischer Organismen" (FUGATO) ins Leben gerufen worden. Ziel der Förderung ist, die optimierte Tierzucht voranzutreiben mit Forschungsschwerpunkten beim Schwein zu Resistenzen gegen Mastitis-Metritis-Agalaktie (MMA), Klauengesundheit und Resistenzen gegen Infektionen des Respirationstraktes. Zusätzlich wurden Forschungen zu Erbdefekten wie Afterlosigkeit, Spreizersyndrom und Stülpzitzen etabliert.

Im folgenden Kapitel werden bekannte Gen- oder Rassevarianten mit einer Assoziation zu Gesundheitsparametern beschrieben. Dabei werden auch Assoziationen von Gesundheitsparametern mit QTL (Quantitative Trait Loci, siehe auch Kapitel 2.5) beschrieben.

2.2.1 Stand beim Nutztier

Beim Rind sind praktisch bedeutsame Krankheitsresistenzen gegen Trypanosomen bekannt (Murray et al., 1991); dabei gelten die Rassen N' Dama und West African Shorthorn als besonders resistent (Roberts und Gray, 1973; Trail et al., 1994). Im Körper der Tiere wird die Parasitenvermehrung vermindert und die oft zusätzlich schädigende Immunantwort abgeschwächt, so dass es zu einer Toleranz gegen die Trypanosomen kommt. Bei den Schafrassen Suffolk und Texel wurde Nematodenresistenz auf Grund einer Variation im Major Histocompatibility Complex (*DRBI*-Gen) entdeckt (Sayers et al., 2005). Schafe mit einer bestimmten Aminosäuresequenz im ovinen Prionproteingen weisen eine erhöhte Resistenz gegen Scrapie auf (Baylis & Goldmann, 2004). Für die Erforschung der Resistenz gegen atypische TSE-Formen stehen QTL-Modelle bei der Maus zur Verfügung (Lloyd et al., 2002; Moreno et al., 2003). Beim Geflügel sind Resistenzen gegen die Marek'sche Krankheit bekannt (Cole, 1968). In diesem Zusammenhang belegen neuere Studien die Assoziation zwischen einem Marker im Vitamin-D-Rezeptor-Gen und der Empfindlichkeit gegenüber der Marek'schen Krankheit (Praslickova et al., 2008). Resistenz-steigernde Effekte gegenüber Salmonellen werden beim Huhn mit dem *SALI*-Gen und bei der Maus mit dem *Nramp*-Gen in Verbindung gebracht. Studien zeigten, dass Hühner mit einer bestimmten *SALI*-

Genvariante eine deutlich höhere Makrophagenaktivität aufweisen als vergleichbare Gruppen (Wigley et al., 2002). Die Resistenz gegen Kokzidiose beim Geflügel ist mit einem Polymorphismus im *zyxin*-Gen assoziiert (Kim et al., 2006; Hong et al., 2009).

QTL beim Nutztier

Beim Rind sind etwa 900 QTL für etwa 100 verschiedene Merkmale bekannt. Die meisten QTL beziehen sich auf die Milchleistung und die Zusammensetzung der Milch (Geldermann et al. 2005, Kühn et al., 1999, Goertz et al., 2009). Ein QTL für Mastitisresistenz konnte beim Rind von Reinsch et al. (1998) kartiert werden. Für die Rassen Swedish Red, White Finnish Ayrshire und Danish Red sind QTL für die Resistenz gegen Mastitis auf Chromosom 9 bekannt (Sahana et al., 2008). Ein QTL für Arachnomelia beim Schweizer Braunvieh wurde auf Chromosom fünf in der Region um den Marker ETH10 kartiert (Drögemüller et al., 2009). Beim Schaf liegen derzeit ca. 40 QTL vor, die meisten für Merkmale der Resistenz gegen Nematoden (Beh et al., 2002; Davies et al., 2006). Beim Geflügel sind 657 QTL für 112 verschiedene Merkmale wie Wachstum, Eimenge und Verhalten bekannt. Ein QTL für die Resistenz gegen die Marek'sche Krankheit ist von Yonash et al. (1999) beschrieben worden. Ein weiterer QTL für die Antikörperbildung nach Impfung gegen *E. coli* und *Salmonella enteritidis* wurde von Yunis et al. (2002) beschrieben.

2.2.2 Stand beim Schwein

2.2.2.1 Infektionskrankheiten

Beim Schwein ist genetisch bedingte Variationen für Merkmale der Resistenz gegen Infektionskrankheiten (Rothschild et al., 1984; Magnusson et al., 1997) und der Immunantwort (Meeker et al., 1987; Joling et al., 1993; Nguyen et al., 1998) bekannt. In Zuchtexperimenten konnten Schweinelinien mit reduzierter oder gesteigerter Immunantwort selektiert werden (Magnusson et al., 1997; Wilkie und Mallard, 2000). Die beim Schwein bekanntesten kommerziellen Marker richten sich gegen Colienterotoxämie und *E. coli* bedingte Saugferkeldurchfälle. Dabei wird mittels markergestützter Selektion (MAS) auf die jeweils Resistenz vermittelnde Variante des *E. coli*-F18-Rezeptors (*FUT1*; Vögeli et al., 1997) bzw. des *E. coli*-F4-Rezeptors (*MUC4*; Jorgenson et al., 2003) selektiert. Der Genlocus

des F4ab/ac-Rezeptors liegt auf Chromosom 13 (Peelman, 1999), der Genlocus des *E. coli*-F18-Rezeptors (ECF18R) auf SSC6. Aus patentrechtlichen Gründen stehen allerdings bezüglich der F18-Rezeptoren weder die Marker noch Lizenzen für die Allgemeinheit zur Verfügung.

Resistenzen gegen verschiedene Krankheitserreger und Krankheiten des Schweins sind schon lange bekannt, z.B. gegen *Brucella suis* (Cameron et al., 1940), Rotlauf, Dysenterie und Rhinitis atrophicans (Hutt, 1958). Eine verbesserte Immunantwort nach Impfung gegen *Bordetella bronchiseptica* beschrieben Rothschild et al. (1984) in Abhängigkeit von Haplotypen des MHC-Komplexes. Eine gesteigerte Resistenz gegen Salmonellen-Infektionen kann mit *NRAMP1* auf Chromosom 15 des Schweins in Verbindung gebracht werden (Blackwell, 1996; Tuggle et al., 1997; Sun et al., 1998). Im Zusammenhang mit dem FUGATO-IRAS-Projekt wurde eine Resistenz der Rasse Hampshire gegen die Infektion und Erkrankung durch *Actinobacillus pleuropneumoniae* nachgewiesen (Hoeltig et al., 2009).

Eine Resistenz gegen die Infektion mit dem Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) wurde bei Duroc (Halbur et al. 1998) und beim Miniaturschwein (Reiner et al., 2009) nachgewiesen. Durch die geringere Virusreplikation in Milz und Tonsillen gelten Warzenschweine als relativ resistent gegen das Virus der Afrikanischen Schweinepest (Oura et al. 1998). Die apoptosevermittelnde Zytokinausschüttung aus infizierten Makrophagen scheint dabei der resistenzauslösende Faktor zu sein. Im Zusammenhang mit der Impfung gegen die Aujeszky'sche Krankheit konnte Rothschild et al. (1984) einen unterschiedlichen Immunrespons nachweisen. Schweine der Rasse Yorkshire und Chester White hatten deutlich höhere Impfantikörpertiter als Schweine der Rassen Hampshire, Duroc und Landrasse. Edfors-Lilja et al. (1998) konnten genetische Unterschiede hinsichtlich Resistenz gegen das Pseudorabiesvirus auf unterschiedliche Interferon- α -Produktion zurückführen.

Eine verminderte Empfänglichkeit gegen Parasiten wurden hinsichtlich *Ascaris suum* (Wakelin, 1978) und *Trichinella spiralis* insbesondere beim Minischwein (Lunney und Murrel, 1988) beschrieben. Der Resistenzmechanismus konnte mit dem MHC-Komplex in Verbindung gebracht werden (Madden et al. 1993).

Im Vergleich zwischen europäischen Pietrain und chinesischen Meishan Schweinen zeigten sich deutliche Unterschiede im Hinblick auf eine Infektion mit *Sarcocystis miescheriana*. Ausgehend von der gleichen Infektionsdosis bildeten sich bei Schweinen der Rasse Pietrain etwa 20 Mal mehr Merozoiten pro Gramm Muskulatur als bei Meishan Schweinen (Reiner et al., 2007c).

2.2.2.2 Konstitutionelle Aberrationen

Die bekannteste Resistenz gegen eine nicht-infektiöse Erkrankung beim Schwein betrifft das *RYRI*-Gen. Eine Punktmutation (c.1843C>T) im *RYRI*-Gen ruft die durch Stress oder Halothan-Narkose (Löscher, 2006) induzierbare Maligne Hyperthermie hervor (Fuji et al., 1991). Da durch diesen Defekt noch weitere Symptome ausgelöst werden können, spricht man auch vom Porcinen Stress Syndrom (PSS). Durch den Defekt im *RYRI*-Gen kommt es zu einer erhöhten Kalzium-Freisetzung in die Muskelzelle und somit zur Aktivierung der Muskelfasern. Der Zellstoffwechsel wird gesteigert, insbesondere die anaerobe Glykolyse. Hierdurch kommt es zu überschießender Laktatproduktion und Hyperthermie. Der Gendefekt wurde früher vorwiegend bei auf Fleischfülle gezüchteten Rassen (z.B. Pietrain, Belgische Landrasse, Deutsche Landrasse im Universaltyp) nachgewiesen. Nach der Schlachtung traten vermehrt PSE- oder DFD-Fleisch auf. Durch eine ab 1992 erfolgreich und konsequent umgesetzte Selektion gegen die empfindliche Variante des *RYRI*-Gens konnte das Krankheitsbild erfolgreich aus den meisten Schweinepopulationen entfernt werden (Lee et al. 2002). Heute findet man bei Pietrain-Ebern die stressempfindlichen Allele aufgrund ihrer engen Assoziation mit der Fleischfülle als homozygote Variante PP (stressresistente Variante NN). Eber mit der stressempfindlichen Variante PP werden bei stressresistenten Muttersauen (z.B. Deutsche Landrasse (Biedermann et al., 2000)) vor allem in Bayern als Vaterrasse für besonders fleischreiche Schlachtschweine eingesetzt (siehe z.B. Eberkatalog PIC). Der züchterische Fortschritt erlaubt es den Landwirten mittlerweile stressresistente Pietrain Eber (NN) einzusetzen, die sich trotz MHS negativem Genotyp durch eine hohe Fleischfülle auszeichnen (Biedermann et al., 2000).

2.2.2.3 QTL beim Schwein mit Assoziation zu konstitutionellen Aberrationen und Empfindlichkeit gegenüber Infektionskrankheiten

Beim Schwein sind derzeit ca. 1800 QTL bekannt. Die meisten beziehen sich dabei auf Leistungsparameter wie Bemuskelung, Fleischqualität und Magerfleischanteil (Karlskov-Mortensen et al., 2006). Einige QTL zeigen Auswirkungen auf Fortpflanzungsparameter (insbesondere die Wurfgröße). Neuere Forschungen beschreiben QTL für Stülpzitzen (Jonas et al. 2008). Der Defekt führt zu einer verminderten Aufzuchtleistung der Sau, da ein ausreichender Milchfluss verhindert wird. Außerdem werden Stülpzitzen mit gesteigerter

Mastitisinzidenz in Zusammenhang gebracht. Auch für die Atresia ani konnten QTL identifiziert werden. Sie liegen auf den Chromosomen 1, 3 und 12 (Wiedemann et al., 2005). Diese QTL könnten die Selektion gegen Defekte und Krankheit beim Schwein maßgeblich unterstützen. Die ersten QTL für die Resistenz gegenüber einer Infektionskrankheit beim Schwein, wurden anhand des Pseudorabiesvirus (PrV), dem Erreger der Aujeszky'schen Krankheit kartiert (Reiner et al., 2002). Für die Ausbildung neurologischer Symptome bei der Aujeszky'schen Krankheit sind zwei QTL auf Chromosom 6 und 9 verantwortlich. Im Bereich der QTL liegen Gene für die Rezeptoren, die die Adsorption und Penetration des PrV in die Nervenzelle ermöglichen. Ein weiterer QTL zeigt eine Kopplung zur Region des Interferon-gamma (INF- γ), einem bedeutenden Aktivator der Immunantwort, insbesondere bei viralen Erkrankungen. Aktuelle Ergebnisse beschreiben QTL für die Resistenz gegenüber *Sarcocystis miescheriana* beim Schwein (Reiner et al., 2007b). Der protozoische Parasit dient dabei in erster Linie als Modell, um die Interaktion zwischen Wirt und protozoischen Erregern besser verstehen zu lernen. Dieses Modell wurde aber auch als Belastung für den Organismus eingesetzt, um Effekte von QTL, die unter physiologischen Bedingungen noch nicht entdeckt werden konnten, sichtbar zu machen. In dieser Funktion spielt *S. miescheriana* auch für die vorliegende Arbeit eine wichtige Rolle. Der Erreger soll daher im Folgenden unter Verweis auf ausführlichere Darstellungen kurz skizziert werden (Eckert et al., 2005).

2.2.2.3.1 *Sarcocystis miescheriana*

Der Erreger *Sarcocystis* (*S.*) *miescheriana* gehört zur Gruppe der Apicomplexa. Eine detaillierte Übersicht zum Erreger findet sich in den Dissertationen von Hepp (2006) und Berge (2008). Der Parasit wurde exemplarisch für diese Untersuchung ausgewählt, um eine Belastung der Tiere unter genau definierten Bedingungen zu provozieren und gesundheitsassoziierte Genvarianten in den Rassen Pietrain und Meishan aufzuzeigen, deren Entdeckung ohne diese spezifische Belastung weniger wahrscheinlich erschien. Der Protozoe erschien hierzu besonders geeignet, da er kein Zoonoseerreger ist und aufgrund der obligaten Heteroxenität nicht direkt zwischen Schweinen übertragen werden kann. Aufgrund der sehr guten Steuerbarkeit der Infektion können relativ milde klinische Symptome ausgelöst werden, eine Strategie, die den Anforderungen des Tierschutzes entgegen kommt. Das Schwein ist Zwischenwirt; als obligatorischer Endwirt treten der Hund und andere Carnivoren auf. Die Aufnahme der für den Zwischenwirt infektiösen Sporozysten erfolgt oral über den Kot des

infizierten Endwirtes. Die infektiöse Sporozyste enthält vier Sporozoiten, die im Darm freigesetzt werden. Über das Blut gelangen sie zur Leber. Hier findet nach etwa einer Woche die erste Schizogonie statt. Die zweite Schizogonie erfolgt um Tag 14 post infektionem (p.i.) in den Endothelzellen verschiedener Organe. Ab der fünften Woche p.i. kommt es zur Formation der Miescherschen Schläuche in Skelett- und Herzmuskulatur. Dabei handelt es sich um intrazelluläre, dünnwandige Gewebezysten, angefüllt mit infektiösen Merozoiten (Erber & Geisel, 1979; Barrows et al., 1982). Für den Endwirt ist *S. miescheriana* weitgehend apathogen. Betroffene Schweine als Zwischenwirt fallen bei Ingestion einer kritischen Oozystenmenge durch reduzierte Leistung und variable klinische Symptome auf. Der Krankheitsverlauf kann in die akute Phase (um Tag 14) und die chronische Phase (repräsentiert durch Tag 42) eingeteilt werden. Während der zweiten Schizogonie treten die stärksten klinischen Symptome wie Inappetenz, hohes Fieber, Thrombozytopenie, Anämie und Zyanosen an Ohren und Rüsselscheibe auf (Zielasko et al., 1981). Die chronische Sarcocystose bleibt normalerweise und in Abhängigkeit von der Zahl der aufgenommenen Sporozysten symptomlos (Dauguschies et al., 1989). *S. miescheriana* ist weltweit verbreitet (Tenter, 1995). Epidemiologische Untersuchungen für Mitteleuropa zeigen, dass Antikörper gegen den Parasiten bei 10 – 35 % der Schweine vorkommen. In Südhessen waren 28,6 % der Sauen (Damriyasa, 2001) für *Sarcocystis* spp. seropositiv.

Hinweise auf genetisch bedingte Resistenzunterschiede hinsichtlich der Sarcocystose zeigen sich im Vergleich der Rassen Meishan und Pietrain (Reiner et al., 2002). Nach Infektion mit 50.000 Sporozysten konnten signifikante Unterschiede in der Rektaltemperatur festgestellt werden. Meishan-Schweine zeigten an Tag 42-45 p.i. eine signifikant niedrigere Körpertemperatur als Pietrain-Schweine. Die Anzahl der Bradyzoiten pro Gramm Muskulatur im *Musculus longissimus dorsi* und im Herzmuskel war bei der Rasse Pietrain um den Faktor 20 höher als bei der Rasse Meishan.

2.3 Genomische Selektion und SNP-Chip Technologie

Die aktuelle Genomkarte des Schweins (U.S. Pig Genome Mapping Site www.animalgenome.org/pigs/) umfasst 2473 Typ 2 Loci (Marker mit unbekannter Funktion) und 1588 Typ 1 Loci (funktionelle Loci, meist proteinkodierende Gene). Mit dieser Markerzahl werden alle Chromosomen erfasst mit einem durchschnittlichen Markerabstand von 1 cM. Zur Erarbeitung funktioneller SNPs (Marker vom Typ 1) bedarf es der Definition

von Kandidatengenenen, deren Genvarianten (sofern vorhanden) mit der Variabilität des Phänotyps assoziiert werden können. Zur Absicherung des Zusammenhangs zwischen SNP und Phänotyp sind große Tierzahlen und ausgezüchtete Populationen notwendig (Haley & Anderson 1997). Es ist ein weiter Weg bis hierhin, insbesondere weil die meisten Gene nicht solitär für die Realisierung eines Phänotyps verantwortlich sind, sondern an dieser Aufgabe zusammen mit mehreren oder zahlreichen Genen partizipieren, insbesondere bei Merkmalen der Fitness und Krankheitsresistenz (Soller, 1994; Schwerin et al., 2000). Solche Genorte, die an der quantitativen Variabilität eines Phänotyps beteiligt sind, werden als QTL (quantitative trait loci) bezeichnet (s.u.). Nur wenige SNPs mit bekannter Assoziation zum Zielmerkmal stehen bislang für die genomische Selektion, insbesondere im Hinblick auf Gesundheitsparameter beim Schwein zur Verfügung. Ein erster kommerzieller SNP-Mikroarray (Illumina, InfiniumHD iSelect CustomKit) für die Spezies Schwein basiert daher im Wesentlichen auf anonymen Markern. Er steht seit Anfang des Jahres 2009 zur Verfügung und enthält 30.000 SNPs (Kaminski et al. 2005, 2008). Ziel ist die Entwicklung der genomischen Selektion auf Basis von ca. 100.000 funktionellen Genmarkern. Wäre die Funktion jeder einzelnen Genvariante bekannt, so könnte theoretisch auf Phänotypen- und Nachkommenprüfungen vollständig verzichtet werden. Da es sich bis jetzt aber fast ausschließlich um anonyme Marker handelt und damit die Möglichkeit der Phasenverschiebung zwischen Markerallel und Phänotyp besteht, kann bislang noch nicht auf die Nachkommenprüfung verzichtet werden. In der Humanmedizin werden sogenannte MegaSNPHunter eingesetzt, die eine Suche nach prädisponierenden SNPs durchführen, die mit Erkrankungen wie Parkinson und Rheuma in Verbindung gebracht werden (Wan et al. 2009). Der humane SNP-Genchip umfasst bereits über 300.000 SNPs. So konnten erfolgreich Genorte für Diabetes (Typ 2) (Scott et al., 2007), Morbus Crohn (Duerr et al., 2006) und Chronische lymphatische Leukämie (Di Bernardo et al., 2008) identifiziert werden. Auch beim Rind steht bereits ein Genchip (mit bislang etwa 100.000 SNPs) zur Verfügung (Daetwyler et al., 2008). Beim Schaf kann ein Genchip mit etwa 60.000 SNPs eingesetzt werden (McEvan et al., 2008).

2.4 Etablierung gesundheitsbestimmender Genvarianten mittels Genomanalyse

Nicht zuletzt zur Etablierung funktioneller SNPs ist es wichtig, die molekularen Ursachen für phänotypische Variation in Gesundheitsmerkmalen mittels Genomanalyse zu identifizieren

und Kandidatengene zu definieren. Kandidatengene sind Gene von denen man annehmen darf, dass sie einen Teil der phänotypischen Variation erklären, bzw. dass sie gerade für diese Variation verantwortlich sind (Brade, 2003). Durch die Definition von Kandidatengen kommt es zur erheblichen Eingrenzung auf der Suche nach der verantwortlichen Genvariante. Erst dadurch wird eine genauere Untersuchung solcher Gene möglich und umsetzbar. Kandidatengene lassen sich auf drei Wegen identifizieren: Homolog-Physiologische Kandidatengene (Identifizierung über den bekannten pathophysiologischen Zusammenhang oder über einen bekannten Zusammenhang mit dem Zielmerkmal bei einer anderen Spezies), positionelle Kandidatengene (Identifizierung über ihre Position im Bereich eines mit dem Zielmerkmal assoziierten QTL) und funktionale Kandidatengene (Identifizierung über die differentielle Expression von Genprodukten bei Tieren, die sich hinsichtlich des Zielmerkmals unterscheiden). Zur Definition positioneller Kandidatengene dient die QTL-Analyse (Haley & Andersson, 1997).

2.4.1 QTL-Analyse

Beim Nutztier verfügen eine Reihe von Merkmalen aus den Bereichen der Mast- und Schlachtleistung, aber auch der Reproduktion und der Krankheitsresistenz, über ausgeprägte Variabilität, die folglich auf verschiedene Varianten zugrunde liegender Gene zurückgeführt werden müssen. Nur selten zeigt sich dabei ein Einzelgencharakter. Meist werden Zielmerkmale durch mehrere Gene bestimmt (oligogen oder polygen). Die Gene, die sich an der Variabilität quantitativ verteilter Merkmale beteiligen, werden als Quantitative Trait Loci bezeichnet (Geldermann 1975).

Um eine QTL-Analyse durchführen zu können müssen mindestens vier Voraussetzungen erfüllt sein (Falconer & Mackay, 1996; Haley & Andersson, 1997): Es muss ein geeignetes Tiermodell zur Verfügung stehen. Beim Schwein verwendet man häufig F₂-Familien aus genetisch und phänotypisch stark divergierenden Ausgangsrassen, die sich auch im Zielmerkmal möglichst stark unterscheiden. Häufig werden europäische Rassen und chinesische Rassen kombiniert. Es ist bekannt, dass diese Rassen nicht nur phänotypisch, sondern auch genetisch oft hinreichend große Distanzen aufweisen und für viele Kandidatengene verschiedene Allele tragen (Thuy et al., 2006).

Die Phänotypen müssen unter weitgehender Ausschaltung von Umwelteffekten und möglichst präzise erhoben werden. Es müssen geeignete Laborverfahren, Genkarten und informative

Genmarker zur Verfügung stehen, damit die genom- und chromosomweite Zuordnung der Allelherkünfte möglich wird.

Bei den eingesetzten DNA-Markern handelt es sich um funktionelle (Typ I Marker) oder nicht funktionelle (Typ 2 Marker) Genmarker, deren Lage im Genom bekannt ist. Die meisten Marker sind in ihrer Funktion unbekannt. Für die QTL-Analyse benötigt ein Marker bekannte und differenzierende Allele. Markerabstände von etwa 25 cM (1 Centimorgan, benannt nach T.H. Morgan, ist der Abstand zweier Genloci auf einem Chromosom, der durch eine Rekombinationshäufigkeit von 1% charakterisiert ist; d.h., dass bei nur einem von hundert Nachkommen eine Rekombination der Allele zwischen zwei Markern auftritt) sind für die QTL-Analyse ausreichend um das Genom des Schweins abzudecken (Darvasi et al., 1993). Innerhalb dieses 25 cM Bereiches liegt ein Genomabschnitt von 15-20 Mio. Basenpaaren und 300-400 Genen.

Für das Schwein sind über 4000 Genmarker bekannt (U.S. Pig Genome Mapping Site www.animalgenome.org/pigs/). Das Genom des Schweins hat eine Länge von ca. 2,3 Morgan und umfasst damit etwa 3 Mrd. Basen. Die genetische Kartierung dieser Marker basiert auf der Erfassung der Rekombinationsraten zwischen den Markern (Kopplungskarte), die als Maß für die Abstände zwischen ihnen benutzt werden.

Die QTL-Analyse berechnet genomweit die Signifikanz der Regression zwischen phänotypischer Merkmalsausprägung und Herkunft der QTL-Allele von der empfindlichen und/oder unempfindlichen Foundergeneration. Die chromosomale Position mit der höchsten Signifikanz und damit der engsten Kopplung zwischen Zielmerkmal und Allelherkunft, bezeichnet dabei die Lage des QTL. Als Maß für die Enge der Kopplung dienen der F-Wert oder der LOD-Score (Morton, 1955).

Die QTL-Analyse erlaubt unter anderem abzuschätzen, ob die Variabilität eines Phänotyps durch wenige Genorte mit starken oder durch viele Genorte mit geringen Effekten bedingt wird. Nur in erstem Falle wird die Suche nach Markern, die im Sinne der Markergestützten Selektion (Dekkers, 2004) eingesetzt werden können, erfolgreich sein.

In der Tierzucht können QTL zur Verkürzung des Generationsintervalles (Kalm 2000) und zur Steigerung der Selektionsgenauigkeit eingesetzt werden (Smith und Simpson 1986). Mittlerweile wird eine Vielzahl solcher Verfahren in Form von Gentests in der kommerziellen Züchtung eingesetzt (Stranzinger & Went, 1996; Simianer, 2000).

2.4.1.1 QTL für klinisch-chemische Merkmale als Gesundheits- und Resistenz-definierende genetische Faktoren

Da Empfindlichkeit und Resistenz von Tieren und Populationen auch anhand klinischer und klinisch-chemischer Bilder unter definierten Gesundheits- und Umweltbedingungen definiert werden können, haben Reiner et al. in verschiedenen Arbeiten QTL für hämatologische Werte (Reiner et al. (2007a), für das weiße Blutbild (Reiner et al., 2008) sowie für verschiedene klinisch-chemische Werte (Reiner et al., 2009) kartiert. Ein Ergebnis dieser Studien war die Kartierung eines QTL für die Serum-Aspartat-Aminotransferase-Aktivität (sAST) auf SSC14 im Bereich der GOT1 (Reiner et al., 2007b). Hieraus ergibt sich ein potentieller Zusammenhang zwischen sAST und möglichen Varianten im Gen der GOT1 als mögliche Teilerklärung der einschlägig beschriebenen Variabilität der sAST Spiegel innerhalb und zwischen verschiedenen Rassen und Populationen (Heinritzi Plonait 2001, Kixmüller, 2004).

2.5 Aspartat-Aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1.)

2.5.1 Rolle im Stoffwechsel

Die Aspartat-Aminotransferase ist ein Enzym. Enzyme sind Katalysatoren biologischer Systeme (Stryer, 1996). Sie beschleunigen die Reaktionsgeschwindigkeit der Stoffwechselfvorgänge im Körper um das tausendfache (Pschyrembel, 2002). Chemisch gehören sie zu den Proteinen. AST, früher auch Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) genannt, ist ein Enzym, das in Skelettmuskulatur, Leber, Niere, Herz, Pankreas, Milz, Lunge und in den Erythrozyten vorkommt. Es sind zwei Isoenzyme, eine zytosolische und eine mitochondriale AST, bekannt (Christen et al. 1985). Die sAST-Werte gehen aus einer Zusammensetzung von zytosolischer AST (cAST), die durch das *GOT1*-Gen codiert werden und mitochondrialer AST (mAST), die durch das *GOT2*-Gen codiert werden, hervor. In der Leber findet sich zu 80 % mitochondriale AST.

Im Serum ist die Aktivität der AST (sAST) insbesondere bei Zellnekrosen aber auch bei Membranschädigungen in erhöhtem Maße nachzuweisen. AST ist nicht organspezifisch (Kraft et al. 1999). Beim Schwein findet sich die höchste Aktivität von AST im Herzmuskel, gefolgt von Leber, Niere und Skelettmuskel (Boyd, 1983; Kixmüller, 2004). Dennoch wird die sAST ebenso wie die Kreatinkinase als Indikatorenzym für Muskelzell- und/oder

Leberzellschädigungen verwendet. Dabei kann insbesondere aus dem Verteilungsquotienten CK/AST auf den Ursprung der Serumenzyme geschlossen werden.

Die Halbwertszeit der AST im Blut ist deutlich länger als die der Kreatinkinase. sAST bleibt je nach Ausmaß des Muskelschadens über mehrere Tage im Blut nachweisbar. Die AST benötigt für ihre Funktion Pyridoxalphosphat, welches als prosthetische Gruppe an das Enzym gebunden ist. AST katalysiert dabei die Reaktion:



Die AST ist einbezogen in viele zentrale metabolische Kreisläufe wie z.B. den Abbau von Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fetten (Barouki et al. 1989). Sie spielt auch eine große Rolle in der Gluconeogenese (Abb. 1).

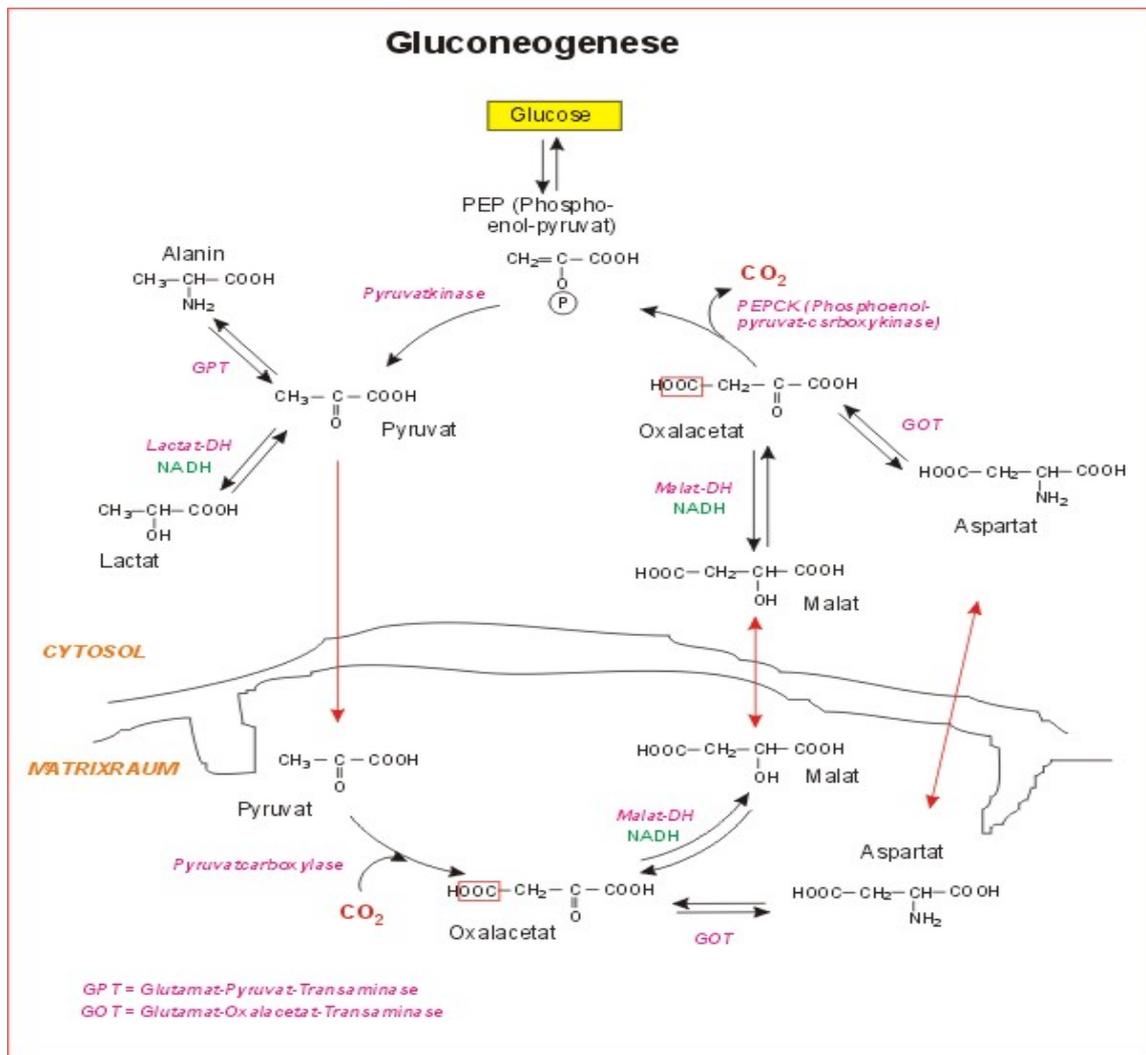


Abb. 1 Rolle der AST in der Gluconeogenese (http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/Gluconeogenese.jpg)

Oxalacetat, das durch AST gebildet wird, kann direkt in den Gluconeogenese-Kreislauf eingeschleust werden (Horio et al., 1988). Im Malat-Aspartat-Kreislauf ist AST als zytosolische und mitochondriale Form beteiligt. Der Malat-Aspartat-Zyklus ist ein System, das indirekt NADH vom Zytosol in die Mitochondrien schleust, damit das in der Glykolyse entstandene NADH, der in den Mitochondrien lokalisierten Atmungskette zur Verfügung steht, um als Energieträger für die ATP-Synthese genutzt zu werden (Berg et al. 2007). Die zytosolische AST katalysiert die Umwandlung von aus dem Mitochondrium durch den Glutamat-Aspartat-Carrier transportierten Aspartat in Oxalacetat, unter Verwendung von alpha-Ketoglutarat. Oxalacetat kann bei ungenügender Glucoseaufnahme für die Gluconeogenese verwendet werden. Alpha-Ketoglutarat wird durch den Malat-alpha-Ketoglutarat Carrier aus dem Mitochondrium in Austausch mit Malat heraus transportiert. Das entstandene Oxalacetat wird durch die zytosolische Malat-Dehydrogenase zu Malat wobei NADH zu NAD oxidiert wird. Das durch den Carrier in das Mitochondrium transportierte Malat wird mit Hilfe der mitochondrialen Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat; NADH wird frei. Oxalacetat wird durch die mitochondriale AST zu Aspartat und über den Glutamat-Aspartat-Carrier wieder ins Cytosol geschleust (Abb. 2).

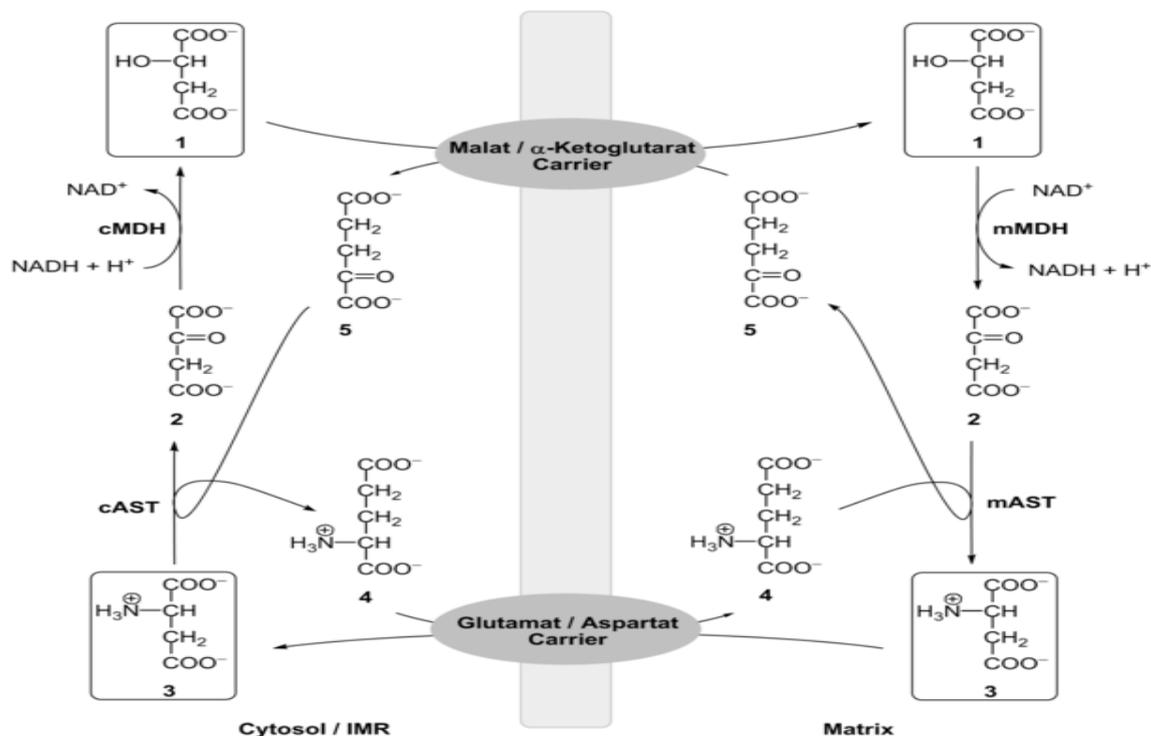


Abb. 2 Malat-Aspartat-Shuttle (www.biocarta.com/pathfiles/h_malatePathway.asp).

(1) Malat; (2) Oxalacetat; (3) Aspartat; (4) Glutamat; (5) α-Ketoglutarat; **cMDH** cytosolische Malat-Dehydrogenase; **mMDH** mitochondriale Malat-Dehydrogenase; **cAST** cytosolische Aspartat-Aminotransferase; **mAST** mitochondriale Aspartat-Aminotransferase; IMR Intermembranraum.

Die Struktur der zytosolischen Aspartat-Aminotransferase besteht aus zwei Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 92.700 Da. Jede Untereinheit enthält eine große und kleine Domäne. Die aktive Seite ist zwischen den Domänen lokalisiert. Bei Aktivität des Enzyms ist das Coenzym Pyridoxalphosphat an der großen Domäne gebunden. Bei Abwesenheit eines Substrates liegt das Enzym in der sogenannten „offenen“ Form vor. Wenn Substrat (2-Methylaspartat) gebunden wird, verändert sich die Konformation der Untereinheit 1 in eine „geschlossene“ Form. Es handelt sich hier um eine Liganden-induzierte Konformationsänderung (Rhee et al., 1997) (Abb. 3).

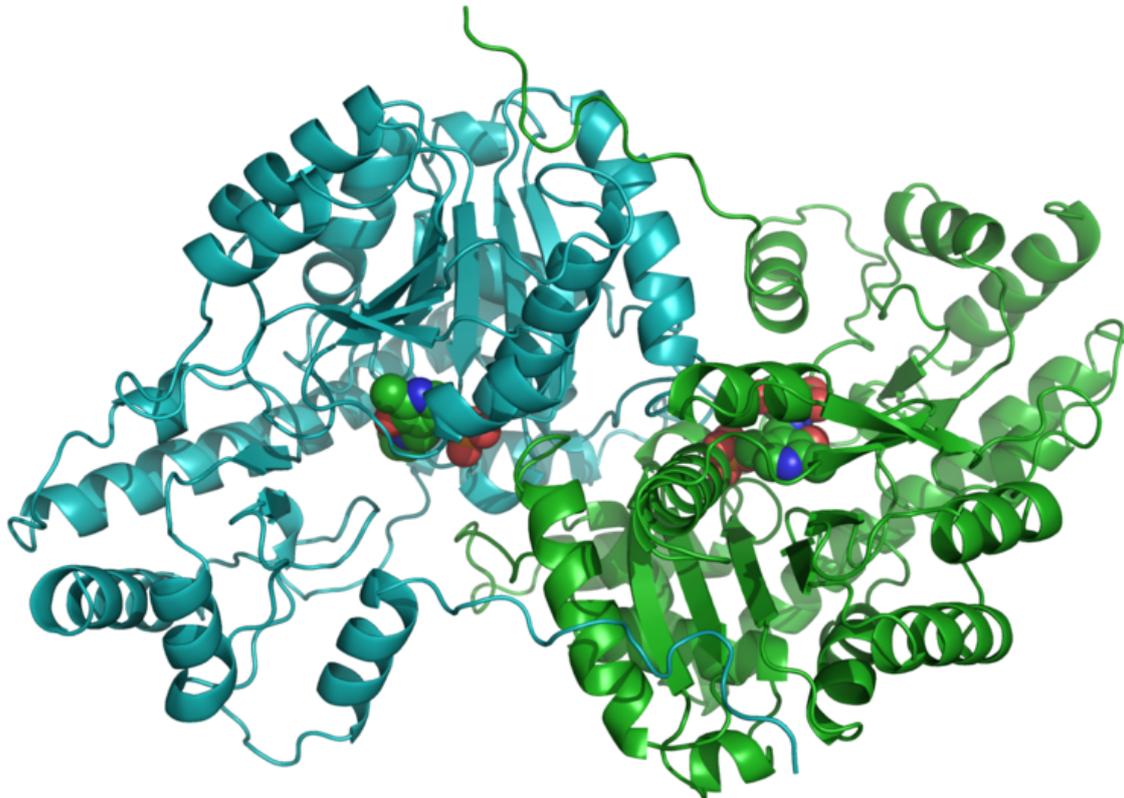


Abb. 3 Zytoplasmatische Aspartat-Aminotransferase (farblich unterteilt in ihre beiden Untereinheiten, gebunden mit Coenzym Pyridoxalphosphat und dem Substrat 2-Methylaspartat (Bändermodell des Dimers vom Wildschwein))
http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:ASAT_1AJS.png&filetimestamp=20081112114214

2.5.2 Aufbau des *GOT1*-Gens

Die sAST-Werte gehen hauptsächlich auf die Aktivität der *GOT1* zurück, deren vollständige Gensequenz während der eigenen Arbeiten (Zeitraum vom 01.05.2008 bis 01.06.2010) beim

Menschen (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281206), der Maus (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14718) und der Ratte (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24401) bekannt war. Bei Tierarten wie Pferd (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100060793), Rind (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281206) und Schwein (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/396967) ist die Gensequenz nicht zugänglich. Es existiert in der Datenbank die mRNA (Schwein: Nagashima et al., 1989; Rind: Harhay et al., 2005). Bei der Maus befindet sich das Gen auf Chromosom 19. Beim Menschen ist das *GOT1*-Gen auf Chromosom 10 im Bereich q24.1-q25.1 lokalisiert. Es besteht ebenso wie bei der Ratte und der Maus aus neun Exons und acht Introns (Obaru et al., 1988). Die Größe des Gens wird bei der Maus mit 32.000 bp angegeben. Die Länge der Exons beträgt zwischen 105-802 bp. Der Vergleich der mitochondrialen mit der zytoplasmatischen *GOT* ergibt, dass ein hoher Homologiegrad zwischen den Introns vorliegt (fünf Exon/Intron Grenzen liegen am selben Ort), was zu dem Schluss führt, dass sie durch Duplikation aus dem selben Ursprungsgen entstanden sein dürften. Die Übereinstimmung zwischen der zytoplasmatischen *GOT* der Maus und des Schweins liegt bei etwa 91% (Christen et al., 1985).

Das *GOT1*-Gen des Schweins ist kartiert auf Chromosom 14. Es ist ein sogenanntes Haushaltsgen (Lia et al., 1995), das unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird (Garlatti et al., 1993). Haushaltsgene sind häufig an zentralen, ständig benötigten Stoffwechselprozessen beteiligt. In der Gendatenbank ist beim Schwein bisher nur die mRNA abgelegt. Es fehlen Informationen über Exongrenzen, die Sequenz der Introns und des Promotors. Die genetische Übereinstimmung von mitochondrialer und cytoplasmatischer *GOT* beträgt beim Schwein 50% (Pave-Peux et al., 1988).

Der Promotor ist eine DNA-Sequenz, welche die Regulation der Expression eines Gens ermöglicht (Pschyrembel, 2002). Die Sequenz liegt am 5'-Ende vor dem RNA-codierenden Bereich. Der Promotor geht spezifische Bindungen mit Proteinen ein, die eine Transkription des Gens durch die RNA-Polymerase starten, fördern, hemmen oder verhindern können (Stryer, 2002). Weiter entfernte Sequenzen wie die Enhancer und Silencer gehören ebenfalls dazu. Im humanen Genom sind 775 verschiedene Promotoren bekannt. Die Sequenzmotive typischer Promotoren sind die TATA-Box (-10 Region), die Konsensussequenz TTGACA (-35 Region) und die AT-Region unterhalb von minus 35 Basen (Smale & Kadonaga, 2003). Eukaryotische Promotoren haben drei RNA-Polymerasen. RNA-Polymerase 1 transkribiert die rRNA, RNA-Polymerase 2 transkribiert die mRNA, und RNA-Polymerase 3 transkribiert die tRNA (Archambault & Friesen, 1993). Jede Polymerase transkribiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und erkennt für jede Polymerase spezifische Bindungsstellen für

Transkriptionsfaktoren, den Promotorbereich selbst und für Upstream-regulatorische Sequenzen. Die Zahl der Transkriptionsfaktoren bei Eukaryonten ist deutlich größer als bei Prokaryonten. An einem Promotor können sich eigene Initiationskomplexe bilden, die die Transkription positiv oder negativ beeinflussen können.

Haushaltsgene wie die *GOT1* besitzen keine TATA-Box. Promotoren funktionswichtiger Gene (Haushaltsgene) werden durch eine CG-reiche Sequenz in etwa 1-2 kb langen DNA-Abschnitten, den CG- oder CpG-Inseln, umgeben. Sie führen zu einer Auflockerung der betreffenden Chromatinbereiche (Geldermann, 2005). Bei der Ratte sind im *GOT1*-Gen Funktionselemente wie die CCAAT-Boxen und Glucocorticoid-Responsive-Elemente (GRE) bekannt (Pave-Preux et al., 1990). Über diese GREs wird bei der Ratte durch Glucocorticoide und cAMP eine positive (Massaad et al., 2000) und durch Insulin eine negative Beeinflussung der cytosolischen AST beschrieben (Aggerbeck et al. 1993). Die mitochondriale *GOT* (*GOT2*), die nicht direkt an der Gluconeogenese beteiligt ist, wird nicht durch Glucocorticoide beeinflusst. Auch durch proteinreiche Diät oder durch langes Fasten wird die Expression der *GOT1* induziert (Tomkiewicz et al., 2004).

Im Promotor des *GOT1*-Gens der Maus gibt es wie bei der Ratte keine CCAAT- und TATA-Boxen. Es finden sich jedoch die möglichen Bindungssequenzen für den zellulären Transkriptionsfaktor Sp1 sowie eine GC reiche Sequenz im Bereich von -100 bp (Obaru et al., 1988). Beim Schwein sind weder die Nucleotidsequenz noch Funktionselemente des Promotors von *GOT1* bekannt. Es liegen auch keinerlei Informationen über SNPs und sonstige Variabilität der Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz des *GOT1*-Gens beim Schwein vor (www.uniprot.org/uniprot/). Bei Mensch und Rind sind ebenfalls keine SNPs im *GOT1*-Gen bekannt (Wang et al. 1999).

2.5.3 Bedeutung von sAST in der klinischen Diagnostik

In der Humanmedizin dient die Bestimmung der sAST-Aktivität als Nachweismethode für Myokardinfarkt oder Leberschädigung. AST kommt in Zytoplasma und Mitochondrien von Herzmuskel und Leber aber auch von Gehirn und Skelettmuskel vor. Bei Schädigung der Zellmembran durch Muskel- oder Leberzellnekrosen tritt vermehrt AST aus der Zelle in das Serum aus und kann bei der Untersuchung vermehrt nachgewiesen werden (Jackson, 2007).

In der Labordiagnostik des Schweins wird die Aktivität der AST aus Plasma oder Serum bestimmt, um abzuklären, ob eine Skelettmuskel-, Leber- oder Gallenwegserkrankung

vorliegt (Harapin et al. 2003). Zudem nutzt man beim Schwein den Quotienten CK/AST um Myopathiefornen voneinander und von Leberzelldegeneration zu unterscheiden. Bei einer Belastungsmyopathie liegt der Quotient bei 100, bei einer diätetischen Myopathie zwischen 20 und 50, bei einer Leberzelldegeneration unter 20. Im Gegensatz zur CK ist AST bei Myopathien auch nach 24 Stunden in der Regel noch deutlich erhöht. Aktivitätssteigerungen bis zum Dreifachen können als leichte Erhöhung, über das Dreifache als schwere Aktivitätssteigerung angesehen werden.

2.5.4 Referenzwerte

Bei gesunden Läufer Schweinen werden die sAST Werte zwischen 16 und 67 IU/l angegeben (Friendship, Henry, 1992). Es kommt zu einem Abfall der AST-Werte bei Mastläufern zwischen 24 und 40 kg (Glawischnig et al.; 1977).

Der Referenzbereich adulter Tiere wird mit 8-35 IU/l angegeben (Heinritzi & Plonait, 2001). Nach Kraft & Dürr (1992) geht der Referenzbereich bei Schweinen bis 35 IU/l. Er hängt jedoch stark von Rasse, Alter und Reproduktionsstatus der Tiere ab. Für Heinritzi und Plonait (2001) gehört AST ebenfalls zu den Enzymen, die durch genetische Unterschiede (Rasse) beeinflusst werden (Tab. 1). Die AST-Werte bei Pietrain Schweinen sind signifikant höher als bei allen anderen Rassen (Merk, 1992; Kixmöller, 2004).

Tab. 1 Referenzblutwerte (nach Heinritzi und Plonait, 2001) bei verschiedenen Rassen im Alter von 10-12 Wochen

	Deutsche Landrasse	Deutsches Edelschwein	Pietrain	Hybrid	Minipig
AST in IU/l	6,8 - 30,4	8,4 - 30,8	5,3 - 40,9	6,6 - 30,2	0 - 42,2

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 F₂-Schweinepopulation

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tierkollektiv untersucht, das in der Dissertation von Hepp (2006) und Berge (2008) ebenfalls bearbeitet wurde. Für nähere Details wird daher auf diese beiden Arbeiten verwiesen. Aus den genetisch und phänotypisch divergierenden Ausgangsrassen Meishan und Pietrain wurde im Vorfeld am Institut für Tierzucht und Biotechnologie der Universität Hohenheim eine informative F₂-Familie erstellt. Nach der Kreuzung von 4 Pietrain-Ebern mit 4 Meishan-Sauen wurden im nächsten Schritt mit 5 F₁-Ebern und 13 F₁-Sauen 139 F₂-Kreuzungstiere erzeugt (Tab. 2) und einheitlich aufgezogen (Hepp 2006).

Im Alter von 8-12 Wochen wurden die Tiere mit einem durchschnittlichen Gewicht von 27 kg in die Ställe der Klinik für Schweine der Justus-Liebig-Universität überstellt. So entstanden 21 Gruppen zu je 5-11 Tieren. Mit dem Tag der Ankunft wurde eine Antibiose für sechs Tage gefüttert (Tiamulin und Chlortetracyclin). Die Fütterung erfolgte ad libitum mit einem handelsüblichen Futter mit 11,5 MJ/kg Energie. Die Schweine wurden über zwei Wochen täglich an den Umgang mit den Betreuern gewöhnt. Die Infektion der Tiere erfolgte 2-3 Wochen nach Einstellung durch orale Verabreichung von 50.000 Sporozysten von *S. miescheriana* je Tier (Genehmigung durch Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießen, Aktenzeichen: GI 18/15-Nr.43/2001 vom 17.12.2001). Die Infektionsstadien wurden am Institut für Parasitologie der Universität Leipzig (AG Dauschies) erstellt.

An den Versuchstagen 0 (Tag 0), 14 (Tag 14), 28 (Tag 28) und 42 (Tag 42) wurden Blutproben entnommen und verschiedene klinisch-chemische Parameter bestimmt. Die Messung des Serum-Enzyms Aspartat-Aminotransferase (sAST) erfolgte mittels optimierter Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (DGKC) und nach IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

Die Versuchstiere wurden am Tag 70 euthanasiert und anschließend zur Sektion in das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verbracht.

Tab. 2: Tierzahlen und Aufbau der F₂-Familie

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

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

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

3.1.2 Kommerzielle Schweinepopulation

Die kommerzielle Schweinepopulation umfasste 164 weibliche Schweine aus sieben verschiedenen privaten Herdbuchzuchtbetrieben im süddeutschen Raum. Für nachfolgende Untersuchungen wurden sowohl Serum- als auch EDTA-Blutproben gewonnen. Der Beprobungszeitraum erstreckte sich von November 2008 bis Mai 2009.

3.2 Material

3.2.1 Geräte und Labormaterial

Thermocycler:	T-Gradient, Whatman Biometra, Göttingen
Photometer:	Ultrospec 1100pro, Amersham Biosciences, Freiburg
Zentrifugen:	Biofuge fresco, Heraeus, Osterode Micro Centrifuge SD 220, Roth, Karlsruhe
Pipetten:	Biohit GmbH, Rosbach v. d. Höhe Roth, Karlsruhe
Mikrowelle:	HF 1210, Siemens, München

Elektrophoresekammer:	Horizon 58, Biometra, Göttingen
Pyrosequencer:	Pyromark ID, Biotage, Hamburg
Magnetschüttler:	Vario Monoshake, Roth, Karlsruhe
Wärmeschrank:	UM 400, Memmert, Schwabach
Klin.-chem. Analysengerät:	Fuji Dri-Chem 3500i, Scil, Viernheim
PCR-Platten:	PP 96well, Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
PSQ-Platten:	PSQ 96 Plate Low, Biotage, Hamburg
Bildanalysesystem mit Kamera:	BioDocAnalyze, Biometra, Göttingen Canon G2 Power Shot, Cannon Inc. Tokio

3.2.2 Chemikalien und Enzyme

Ethidiumbromid	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethanol	Fa. Roth, Karlsruhe
Agarose	Fa. Biozym, Hess. Oldendorf
Primer	Fa. Biomers.net GmbH, Ulm
Qiagen Multiplex PCR-Kit	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
Dri-chem-Slides	Fa. Scil, Viernheim
100 Basenpaar-Leiter	Fa. AppliChem, Darmstadt
Streptavidin Sepharose	Fa. GE HealthCare, München
PyroMark Gold Q96 Reagents	Fa. Qiagen, Hilden
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Tris	Fa. Roth, Karlsruhe
EDTA	Fa. Roth, Karlsruhe
NaOH	Fa. Roth, Karlsruhe

3.2.3 Lösungen und Puffer:

1x TE-Puffer

10 mM Tris 1 mM EDTA

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat
5 mM Natrium-Acetat
1 mM EDTA

Denaturation solution

0,2 M NaOH

Annealing Buffer (Fa. Qiagen, Hilden)

100 mM Tris-Cl
10 mM Mg-Cl₂

Binding Buffer (Fa. Qiagen, Hilden)

10 mM Tris-HCl
2 M NaCl
1 mM EDTA
0,1% Tween 20

Washing Buffer pH 7,60 (Fa. Qiagen, Hilden)

50 mM MOPS-KOH
0,75 M NaCl
15% Etanol

3.2.4 Computerprogramme und Datenbanken

Datenbanken:

National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov

Pre ensemble! <http://pre.ensembl.org>

UniProt www.uniprot.org

Mapviewer www.ncbi.nlm.nih.gov/mapviewer

Computerprogramme:

Clustal (Alignmentprogramm) www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2

Oligo Primerdesign (Eurofins MWG operon, Ebersberg)

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

QTL-Express www.qtl.cap.ed.ac.uk

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

PSQ Assay Design Software

PyroMark™ ID Software

3.3 Methoden

3.3.1 Datenbankrecherchen

Die Suche nach der Sequenz des *GOT1*-Kandidatengens begann in der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). Es wurde zuerst nach genomischen Sequenzen gesucht. Da zu diesem Recherchezeitpunkt (1.5.2008-1.6.2010) keine genomische Sequenz der *GOT1* des Schweins annotiert war, wurde die Suche auf mRNA-Sequenzen erweitert (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/396967). Auf Basis der mRNA-Sequenz (Acc. No. M24088.1; Nagashima et al., 1989), wurden mit Hilfe genomischer Sequenzen anderer Tierarten (Rind, Maus, Ratte) und des Menschen die Exon/Introngrenzen festgelegt. Hierzu diente das Programm Clustal mit dem Sequenzen aligned werden können. Da relativ große Übereinstimmungen zwischen den heterologen Spezies vorhanden waren, wurden die Exon/Introngrenzen der anderen Tiere auf das Schwein übertragen. Auf Basis dieser Sequenzabschnitte wurden Primer zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen abgeleitet (Tab. 3).

Zur Zeit der Erstellung dieser Arbeit lagen in den Datenbanken keinerlei Informationen über die Promotorsequenz der *GOT1* beim Schwein vor. Die Suche nach Sequenzen wurde daher auf BACs, abgelegt in der Datenbank Pre ensemble! (<http://pre.ensembl.org>), ausgeweitet. BAC ist die Abkürzung für Bacterial Artificial Chromosome. BACs basieren auf den F-Faktoren, den natürlich vorkommenden Plasmiden von *E. coli*. Es sind zirkuläre Moleküle, die Genfragmente bis 300 kb Länge aufnehmen können. Das mit der mRNA durchgeführte Alignment zeigte mehrere infrage kommende BACs. Mit Hilfe des Mapviewers (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapviewer) konnte über die dargestellte Position der richtige BAC gefunden werden. Im Anschluss wurde die BAC-Sequenz mit der mRNA von *GOT1* verglichen (Übereinstimmung 98%) und der Sequenzbereich vor Exon 1 als Promotor

identifiziert. Mit Hilfe dieser Sequenzen wurden Primer zur spezifischen Amplifikation von Promotorsequenzen entwickelt.

3.3.2 Primerdesign

Mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO wurden die Primer (Tab. 3) basierend auf der mRNA des *GOT1*-Gens (Acc.No. M24088) und der BAC-Sequenz CH242-276N12 entwickelt. Bei der Konstruktion der Primer war darauf zu achten, dass keine Schleifen (loops) oder Selbstkomplementaritäten auftraten und die Annealingtemperaturen der Primer gleich waren bzw. maximal 2°C voneinander abwichen. Die Primer hatten eine Länge von 18-26 bp und wurden so positioniert, dass sie direkt am Anfang und Ende eines Exons oder Introns lagen um möglichst wenig Sequenzinformationen zu verlieren. Der gewählte Primernamen setzt sich aus dem Kürzel des Kandidatengens und des Exons oder Introns zusammen.

Tab. 3 Optimierte PCR-Primer

Primername (Lokalisation ¹)	Sequenz	Primer- Position ²	Optimierte Annealing- temperatur °C	Länge (Bp)
AstE1f	ccc ggc cga ctc ctg ctc	f ³ : -26 - -1	63	143
AstE1r	ctc cca ctc cta ggt tga cct tgc	r ⁴ : 94 - 117		
AstE2f	acc gat gat tgc cag cct tg	f ³ : 126 - 145	62	174
AstE2r	ccg ctt ctc ctg aag agc tgg	r ⁴ : 279 - 299		
AstE3f	gtg gga ggg gtg cag tct t	f ³ : 300 - 319	57	124
AstE3r	ccc agg ttg gtg agg ata cgt	r ⁴ : 403 - 423		
AstE4f	aaa atc aca atg gag tct tca	f ³ : 426 - 447	54	101
AstE4r	gaa acc ctg gag atc aag tc	r ⁴ : 502 - 521		
AstE5f	aac gct cct gag ttc tcc at	f ³ : 537 - 557	60	105
AstE5r	ctt cat gac aga ggc gat ct	r ⁴ : 622 - 641		
AstE6f	cgc cgg ttt ctg ttc ccc tt	f ³ : 642 - 662	61	151
AstE6r	tgt aga gcc cga agt tct tgg aga	r ⁴ : 769 - 792		
AstE7f	atg agc gcg tgg gga acc	f ³ : 793 - 810	63	166
AstE7r	cat tca tga aag agc tca ggg tca	r ⁴ : 935 - 958		
AstE8f	gac agg taa cgt gaa gac aat gg	f ³ : 962 - 984	59	139
AstE8r	caa ccc agt gaa gct gaa ca	r ⁴ : 1077 - 1096		
AstE9f	cca agc agg ttg aat atc tg	f ³ : 1102 - 1121	57	820
AstE9r	ctt tag tga aac aac aga ata gaa ta	r ⁴ : 1861 - 1886		
Astpr2f	gga aca ggc ag acta aaa gaa g	f ³ : -932 - -911 ⁵	60	1039
Astpr2r	cct agg ttg acc ttg cgg g	r ⁴ : 91 - 109		

¹: Exon 1-9, Promotor

²: Position in der mRNA- von cASPAT (Acc.No. M24088)

³ :forward primer

⁴ :reverse primer

⁵: Relative Position zum ATG-Startcodon, abgeleitet von der BAC-Sequenz CH242-276N12

3.3.3 Konzentrationsbestimmung der Primer mittels Photometrie

Alle Primer wurden bei der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert und als Lyophilisate geliefert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl des gelösten Primers mit

395 µl 1x TE verdünnt und die Extinktion dieser Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration ergab sich dann aus dem Lambert/Beer'schen Gesetz:

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

E = Extinktion bei 260 nm

e = Extinktionskoeffizient abhängig von der Basenzusammensetzung

c = Konzentration

d = Schichtdicke

3.3.4 DNA-Extraktion

DNA wurde aus EDTA-Blut mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit extrahiert. Hierzu wurden 150 µl Blut mit 560 µl AVL-Puffer gemischt und die Suspension für mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 560 µl 96 %iges Ethanol zu der Probe pipettiert und gemischt. 630 µl dieser Lösung wurden auf eine Säule mit Silicagelmembran (Qiagen spin column) pipettiert und bei 7000 x g eine Minute zentrifugiert. Der verbliebene Rest der Lösung wurde ebenfalls auf die Säule pipettiert und wie oben zentrifugiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl Waschpuffer AW1 bzw. AW2 und einer Zentrifugation bei 7000 x g für 1 min (AW1) bzw. bei 16.000 x g für 3 min (AW2). Die Säule wurde dann in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und nach Zugabe von 60 µl RNase-freiem AVE-Puffer und 5 min Inkubation eine Minute bei 7000 x g zentrifugiert. Die so aus der Silicagelmembran gelöste DNA wurde photometrisch (Ultrospec 1100 pro, Amersham Bioscience, Freiburg) gemessen und im Kühlschrank bei 7°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.3.5 Amplifikation spezifischer *GOT1*-Gensequenzen

3.3.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit dem Multiplex PCR Kit (Firma Qiagen GmbH (Hilden)) durchgeführt. Der 25 µl Ansatz enthielt je 0,2 µmol/l der Primer und 12,5 µl 2x Multiplex PCR Mastermix. Zu jeder Probe wurden 1µl genomische DNA (ca. 50 ng) hinzupipettiert.

Für jedes Primerpaar wurde die Annealingtemperatur in einer Temperaturgradienten-PCR optimiert. Die entstandenen Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese beurteilt und diejenige Annealingtemperatur als optimal angesehen, bei der die Ausbeute an PCR-Produkt am höchsten war, und bei der sich keine unspezifischen Amplifikate zeigten. Mit den optimierten PCR-Bedingungen wurde dann eine PCR mit dem genetischen Material der Großelterntiere (F_0 -Generation: Sauen M 689 und M 690 und Eber Mumm und Mustang) durchgeführt. Das Amplifikat wurde mittels Gelelektrophorese beurteilt und bei ausreichender DNA-Menge für die Sequenzierung vorbereitet.

Tab. 4: Zusammensetzung eines 25 μ l PCR-Reaktionsansatzes

Reagenzien	Volumen [μ l]
2x Multiplex PCR Mastermix	12,5
RNAse-freies Wasser	9,0
Primermix	2,5
DNA	1,0

Tab. 5: PCR-Programm

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

3.3.6 Agarosegelelektrophorese

Alle PCR-Amplifikate wurden auf einem 1,5%igen, Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel (0,4-0,5 μ g Ethidiumbromid/ml Agarose) aufgetrennt. Von den PCR-Produkten wurden 4 μ l

auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit TAE-Puffer bei 120 V konstanter Spannung für 20 min durchgeführt. Eine 100 bp-Leiter diente als Größenstandard. Nach der Elektrophorese wurden die Gele digital aufgenommen und archiviert.

3.3.7 Vorbereitung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden die PCR-Amplifikate mit ExoSAP-IT® behandelt. Hierdurch werden überschüssige Primer durch das hydrolytische Enzym Exonuklease I abgebaut und Nukleotide durch Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Zu 21 µl des PCR-Ansatzes wurden 8 µl ExoSAP-IT® pipettiert, gemischt und der Ansatz für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Enzyme durch Erhitzen für 15 min auf 80°C inaktiviert. Damit waren die PCR-Produkte bereit für die Sequenzierung.

3.3.8 Sequenzierung von Amplifikaten der F₀-Tiere

Die PCR-Amplifikate der ausgewählten F₀-Tiere wurden bei der Firma Qiagen GmbH (Hilden) sequenziert.

3.3.9 Identifizierung von SNPs

Zur Identifizierung von SNPs wurden die Sequenzen der PCR-Amplifikate der F₀-Tiere miteinander verglichen. Hierzu wurde ein Alignment der Sequenzen mit dem Programm CLUSTAL (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalW2) durchgeführt. Nicht übereinstimmende Basen wurden als SNPs interpretiert.

3.3.10 Primerdesign für die Pyrosequenzierung

Die Primer für die Pyrosequenzierung wurden mit der PSQ Assay Design Software 1.0.6 (Biotage, Hamburg) entwickelt (Tab. 6). Nach Angabe der Position des SNPs berechnet die Software die optimalen Primer zur Amplifikation dieses DNA-Abschnittes und einen

Sequenzierungsprimer, der unmittelbar vor dem SNP anheftet. Zur Immobilisierung des Sequenzierungsstranges an Streptavidin-Sepharosekügelchen wurden alle Forward-Primer am 5'-Ende biotinyliert.

Tab. 6 Primer der Pyrosequenzierung

SNP, Position	Primernamen ³ /Primersequenz 5'-3'	Annealing-temperatur, °C	Länge, Bp
1, -793 ¹	SNP1F-BIOTIN-GGT TGA GTG CCT GTG TGG	63	189
	SNP1R-AGG AGG CAA GAC ATG ACG A		
	SNP1SEQ-CCT TGA GGA TCA AGC C	*	
2, -744 ¹	SNP2F-BIOTIN-ACC GAT GAT TGC CAG CCT TG	58	174
	SNP2R-CCG CTT CTC CTG AAG AGC TGG		
	SNP2SEQ-TTG GAA GAG TGG CAG	*	
3, -605 ¹	SNP3F-BIOTIN-TTG CCT TGC TTT GCC TCT C	66	161
	SNP3R-AAT CCG GCG TCT GCA CTC		
	SNP3SEQ-CCT CTG CCA ATC GTG	*	
4, -483 ¹	SNP4F-BIOTIN-CGT GGC AGC TAG AAC ACC AG	66	107
5, -470 ¹	SNP4R-CGG TTT CCT CG ACCT TCA A		
	SNP4SEQ-GTG GCA GCT AGA ACA C		
6, -43 ¹	SNP6F-BIOTIN-CAG TTG CAG CGG TTG GAC	67	143
	SNP6R-AGG AAC CTC GGC AAA GAC TG		
		SNP6SEQ-GAG CTT TCA CCT CGC	
7, +156 ²	SNP7F-BIOTIN-ATT GCC AGC CTT CCC TTT T	66	74
	SNP7R-ATG GGC AGG TAC TCG TGG TT		
		SNP7SEQ-GCT CC ACCT TCC TCA	
8, +255 ²	SNP8F-BIOTIN-GTT CCG GAC CTG TGC TTC	63	58
9, +259 ²	SNP8R-CCG CTT CTC CTG AAG AGC T		
	SNP8SEQ-TTC CGG ACC TGT GCT		

* Der Sequenzierungsprimer ist bei Raumtemperatur aktiv

¹: Relative Position zum ATG Startcodon abgeleitet von der BAC sequence CH242-276N12 (preEnsemble [<http://pre.ensembl.org/>])

²: Position in der mRNA der Sequenz von cASPAT (GenBank Acc.No. M24088)

³: Primernamen, die auf einem "SEQ" enden sind Sequenzierungsprimer

3.3.11 PCR-Amplifikation für die Pyrosequenzierung

Für die Pyrosequenzierung wurde ein 50 µl PCR-Ansatz gewählt (Tab. 7), um eine genügende Menge an Amplifikat für die anschließende Sequenzierung zu erhalten. Die PCR-Bedingungen waren identisch mit denen zur Amplifikation spezifischer *GOT1*-Gensequenzen (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes für die Pyrosequenzierung

Reagenzien	Volumen [µl]
2x Multiplex PCR Mastermix	25
RNAse-freies Wasser	19
Primermix (4 µM)	5
DNA (50 ng/µl)	1

3.3.12 Pyrosequenzierung

Die Genotypen der F₂-Tiere, sowie der Schweine aus der kommerziellen Population wurden mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Die Pyrosequenzierungs-Methode ist besonders für die Sequenzierung kurzer DNA-Fragmente bis etwa 100 Basen geeignet. Ausgehend von einem Sequenzierungsprimer erfolgt die Strangverlängerung durch eine DNA-Polymerase, die die in einer bestimmten Reihenfolge eingespritzten Nukleotide einbaut. Durch den Einbau eines Nukleotids wird ein Pyrophosphatmolekül freigesetzt. Dieses wird in der nachfolgenden Reaktion durch das Enzym ATP-Sulfurylase und in Gegenwart von Adenosin-5'-phosphosulfonat zu ATP konvertiert. Das gebildete ATP wiederum katalysiert den Luciferase vermittelten Umsatz von Luciferin zu Oxyluciferin. Das hierbei freigesetzte Licht ist proportional zu der Menge an gebildetem ATP. Die Lichtsignale werden über eine CCD-Kamera in elektrische Signale umgewandelt und in den Rechner übertragen. Die Höhe der Lichtsignale ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch das Enzym Apyrase abgebaut. Anschließend wird das nächste Nukleotid entsprechend der vorgegebenen Reihenfolge eingespritzt und der beschriebene Vorgang beginnt von neuem.

Zur Vorbereitung für die Pyrosequenzierung wurden jeweils 40 µl der PCR-Produkte mit 40 µl Streptavidin-Beads in Bindungspuffer in eine 96well PCR-Platte vorgelegt und die Platte für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Dadurch wurden die biotinylierten PCR-Produkte an die Streptavidin-Beads gebunden. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde der nicht-biotinylierte DNA-Strang durch Behandlung der Beads mit 0,2 N Natronlauge von dem biotinylierten, immobilisierten DNA-Strang getrennt. In einem weiteren Schritt wurden die Beads mit Waschpuffer gewaschen und Reste von Natronlauge neutralisiert. Anschließend wurden die Beads in eine 96well PSQ-Platte, die mit 0,4 µM Sequenzierungsprimer in 40 µl Annealing-Puffer gefüllt war, überführt. Zum spezifischen Annealing des Sequenzierungsprimers wurde die Platte für 2 min auf 80°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die PSQ-Platte wurde in den Pyrosequencer verbracht. Für die Pyrosequenzierung wurde eine Kartusche mit Nukleotiden, Enzym-Mix und Substrat befüllt und in die dafür vorgesehene Vorrichtung in den Pyrosequenzierungsautomaten gestellt. Nach Eingabe der Dispensierreihenfolge der Nukleotide in die Pyromark ID Software (Biotage, Uppsala, Schweden) wurde die Pyrosequenzierung gestartet. Der Ablauf der Reaktion kann am Computer in Echtzeit verfolgt werden. Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die Genotypen der Tiere mit der gleichen Software analysiert.

3.4 Phänotypen

3.4.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena jugularis adulter Sauen aus privaten Herdbuchzuchtbetrieben. Dafür wurden die Tiere von einer erfahrenen Person sachgerecht mit einer Oberkieferschlinge fixiert. Die Blutentnahme erfolgte von der rechten Seite. Pro Schwein wurden 9 ml EDTA-Blut und 9 ml Vollblut in Serumröhrchen entnommen. Die Blutproben wurden in das Labor der Klinik für Schweine verbracht.

3.4.2 Serumgewinnung

Serum wurde nach Spontangerinnung durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 1500 x g gewonnen und 1,5 ml in Eppendorf Reaktionsgefäße umgefüllt.

3.4.3 Bestimmung der Serum-AST-Werte

Die AST-Werte der F₂-Schweine wurden im Rahmen der Dissertation von Hepp (2006) gemessen. Die AST-Werte im Serum der Tiere der kommerziellen Population wurden im Fuji Dri-Chem Analysengerät gemessen. Das Messprinzip beruht darauf, dass das Endprodukt Oxalacetat der durch Aspartat-Aminotransferase katalysierten Reaktion von der Malat-Dehydrogenase unter NADH-Oxidation zu Malat umgesetzt wird. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional zur AST-Konzentration und wird photometrisch gemessen (optimierte Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (DGKC), 1972).

3.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programmpaket SPSS PC (Statistical Package for Social Sciences, Version 15.0). Die AST-Werte wurden um eine weitgehende Normalverteilung zu erreichen logarithmiert. Mittelwerte, Standardabweichung, Minima, Maxima und Varianzen wurden mit der Prozedur "Descriptives" berechnet.

Die Prävalenzen für die untersuchten SNPs wurden mit der Prozedur "Crosstabs" berechnet. Die Effekte der SNPs in den kommerziellen Populationen wurden mittels Varianzanalyse (Anova) unter Berücksichtigung der Herkunft der untersuchten Sauen ausgewertet.

Die graphische Ergebnisdarstellung erfolgte mit Microsoft Excel 2000.

3.6 Kartierung der *GOT1*

GOT1 wurde mit Hilfe des Softwarepakets Crimap, version 2.4 (Green *et al.*, 1990) nach den Vorgaben von Keats *et al.* (1991) relativ zu den Microsatelliten auf SSC14 kartiert.

3.7 QTL-Analyse

Die statistischen Analysen zur Kartierung von Geneffekten erfolgte mit der online-Anwendung QTL-Express (www.qtl.cap.ed.ac.uk/). Die Analyse beruht auf der Methode der

kleinsten Abweichungsquatre für Inzucht- und Auszucht-Linien (Haley et al., 1994). Das generelle lineare Model war voreingestellt für die Merkmale Geschlecht und Untersuchungsgruppe. Das Infektionsalter wurde als Kovariante mit berücksichtigt. Chromosomenweite und genomweite Signifikanzschwellen wurden durch Permutationstests geschätzt. Auf dem Chromosom 14 des Schweins sind die bekannten Marker Sw2038, Sw2519, Sw716, Sw2515 auf den Positionen 0, 32, 57 und 90 cM zu finden. Die identifizierten *GOT1*-SNPs wurden schrittweise und einzeln in die Mikrosatelliten basierte QTL-Analyse miteinbezogen um die Einflüsse der SNPs auf den QTL zu untersuchen.

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzen von *GOT1* in silico/in vitro

Bezüglich der *GOT1* war bis zum Abschluss dieser Arbeit in der Genbank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) und in der vorliegenden Literatur nur die mRNA-Sequenz bekannt. Um die Promotorsequenz zu erhalten, wurde ein passendes Bacterial Artificial Chromosom (BAC) mit Hilfe des Online Programms Pre ensembl! identifiziert. Die größte Übereinstimmung mit der kompletten mRNA zeigte BAC CH242-276N12. Die Promotorregion liegt direkt vor der bekannten Sequenz des Exon 1 und konnte aus dem BAC für die weitere Genanalyse verwendet werden. Die typische TATA-Box fehlt, was auf den Haushaltsgen-Charakter der *GOT1* auch beim Schwein hinweist.

Schema 1: *GOT1*-mRNA, Exon 1 bis 8 (GenBank Acc.No. M24088)

```
54                                     atggcac
61 ctccatcagt ctttgccgag gttcctcagg cccagccggt ccttgtcttt aagctcattg
121 ctgacttccg ggaggatccg gacccccgca aggtcaacct aggagtggga gcttatcgca
181 ccgatgattg ccagccttgg gttttgccag tcgtgaggaa ggtggagcag aggattgcta
241 atgacagcag cctaaaccac gagtacctgc ccatcctggg cctggcagag ttccggacct
301 gtgcttcccg ccttgccctt ggagatgaca gccagctctt tcaggagaag cgggtgggag
361 ggggtgcagtc tttgggggga acgggtgcac ttcgaattgg agctgagttc ttagcacgat
421 ggtacaatgg aacgaacaac aaagacacgc ctgtctacgt atcctcacca acctgggaaa
481 atcacaatgg agtcttcaact actgctggat tcaaagacat tcggtcctat cgctattggg
541 ataccgagaa gagaggactt gatctccagg gtttctgag tgatctggag aacgctcctg
601 agttctccat ctttgtcctc cacgcctgtg cccacaaccc gacagggacc gacccaactc
661 cggagcaatg gaagcagatc gcctctgtca tgaagcgcg gtttctgttc cccttctttg
721 actcagccta tcagggcttc gcatctggca acctagaaaa agacgcctgg gccattcgct
781 attttgtgtc tgaaggggtc gagctcttct gtgcccagtc cttctccaag aacttcgggc
841 tctacaatga gcgcgtgggg aacctgaccg tggttgcaaa agaaccgat agcatcctgc
901 gagtcctttc ccagatggag aagatcgtgc gagtgacgtg gtccaatccc cctgctcagg
961 gagcgagaat cgtggcccgt acgctctctg accctgagct ctttcatgaa tggacaggta
1021 acgtgaagac aatggctgac cgcattctga gcatgagatc tgagcttagg gcacgattag
1081 aagccctcaa gaccctgga acctggaacc acatcacgga ccagattgga atgttcagct
1141 tcaactgggtt gaaccccaag caggttgaat atctgatcaa cgaaaagcac atctatctgc
1201 taccaagtgg tcggatcaac atgtgtggct taaccaccaa aatctagat tatgtggcca
1261 cctccatcca tgaagctgtc accaaaatcc agtgaagcaa caccaccaa gccagcgcca
1321 cccaagcggg cctctgtctc gtgtgttccc tgccctgcaca aacctgggtc tatacatcac
```

1381 aactgtatta gaggctaccg agggacagaa aaggctgctc tggtgaggta gctgctatth
1441 aaattggccc catgggaaga gaacatctct tgaaaagaaa tgggggcccag ggaatagagc
1501 ccttttgagg gccagagcaa attcaggctt ttatthgaaa agaataaaaa ggtcctthga
1561 tcatgagatg tagatgtctt gccccctcac tagaagcagg agtattgcct gtgtcactca
1621 cgtgctcctg tgtgtthttac tctgtacaaa gtctagtccc aaagatcaag ttgtctgaag
1681 agcaaagtgt gattgtgggt attggctgtg tcattaacag ttgtcctctg gaccagagt
1741 gtctgtctcc ctgctctthc tgcatggctc tgtccctagc cctaagcttg agthctthtag
1801 ggtggctcaag gtaggaata tathtatatt ttaccacac gthaactgaa ataaaagtht
1861 cacagagtca aathttacct tactatgtgg agtacattct ggtaththct thctattct
1921 athctattct athctattct athctattct athctattct gthgtthcac taaagaaata
1981 aaagtgtga ttgagacca t

Schema 2: *GOT1*-Promotorsequenz aus BAC CH242-276N12

169501 ttagtaaatg gcagcactag aathtaaacc taggtgtct agctccagag ctaggthctt
169561 aactgggcat thctaaaaac tgtaatattg ccaacaagat acagaagcat aggaaaggg
169621 gatgaathth aaccagagtg agggthtaagg catagctthta tggaggaggc aththgtctg
169681 gatcttgaag gtcaataggt ggagagaggg gthggggaag gaacaggcag actaaaagaa
169741 gaththgggt accagccagc tgatggcagc aagatctgggt tgagtgcctg tgtgggagaa
169801 aagctggagg gggcggctgc gcccatathc tcaagatcct tgaggatcaa gccctctcag
169861 ataggaaggg gagaaaacgc ccgcaattgg aagagtggca gaaaggaact cctggacact
169921 tcctcttath ttgccttgct thgcctctcg tcatgtcttg cctcctgtct gaaaccaagg
169981 caggtggccc acccacath ctctcaggca gagaaggtca aggtcgcccg cgcgggctt
170041 ggaacggcac gattggcaga ggactcccgt cccgagtga gacgccggat thggctgcta
170101 gcctgagcca ggccaggatg ggtcaggaat gtacgcactc tgcggcgtgg cagctagaac
170161 accagthctg tgggtaccag aaggccggtc ctccggaatt cccgcgggccc accgcctgct
170221 aathctthgg cccttgaagg tcgaggaaac cggctcgcgg tacgactacc gctcggctcc
170281 thctctcagc accggtaggg ccaaggaaca acagcctcag tgataggagg acgctctgcc
170341 aathcagccat agaccgccc catctcggcc ggcgtacagt gcathggtg catcathacc
170401 ggcctctgac aaggtthct ctthggattg gctaatagca thccctcct cctggcctth
170461 ththgtcagaa gctcacgatt ggttaacagc thtgccaaac thccgacag gctcgacat
170521 tggaggccgt gggcccgc cgcctacta ggtgaaggtg agagtctcct ccagthgcag
170581 cggthggacg gtaccgagcg gctccaggcg cgaggthgaaa gctcccggccc gactcctgct
170641 ctctagctat g

4.2 Alignment der *GOT1*-Sequenzen von Pietrain und Meishan

Das Alignment der Meishan-Sauen (M689 und M690) und der Pietrain-Eber (Mumm und Mustang) wurde mit dem Programm CLUSTAL durchgeführt. Nicht übereinstimmende Basen wurden sowohl in der Sequenz des Promotors als auch im Bereich der Exons als SNPs interpretiert.

4.2.1 Promotor

Schema 3: Alignment der Meishan- und Pietrain- Promotor-Sequenzen von *GOT1*

(2.1 Meishan Sau M689, 2.2 Meishan Sau M 690, 2.3 Pietrain Eber Mumm, 2.4 Pietrain Eber Mustang)

```
12957_2.2_ASTPr2f.ab1      GAGAAAAGCTGGAGGGGGCGGCTGCGCCCATATTCTCAAGATCCTTGAGG
12957_2.3_ASTPr2f.ab1      GAGAAAAGCTGGAGGGGGCGGCTGCGCCCATATTCTCAAGATCCTTGAGG
12957_2.1_ASTPr2f.ab1      GAGAAAAGCTGGAGGGGGCGGCTGCGCCCATATTCTCAAGATCCTTGAGG
12957_2.4_ASTPr2f.ab1      GAGAAAAGCTGGAGGGGGCGGCTGCGCCCATATTCTCAAGATCCTTGAGG
*****
-853.....-804

12957_2.2_ASTPr2f.ab1      ATCAAGCCCTCTCAGATAGGAAGGGGAGAAAACGCCCGCAATTGGAAGAG
12957_2.3_ASTPr2f.ab1      ATCAAGCCCTGTCAGATAGGAAGGGGAGAAAACGCCCGCAATTGGAAGAG
12957_2.1_ASTPr2f.ab1      ATCAAGCCCTCTCAGATAGGAAGGGGAGAAAACGCCCGCAATTGGAAGAG
12957_2.4_ASTPr2f.ab1      ATCAAGCCCTGTCAGATAGGAAGGGGAGAAAACGCCCGCAATTGGAAGAG
*****
-803.....-754
.....SNP1.....

12957_2.2_ASTPr2f.ab1      TGGCAGAAAAGAACTCCTGGACACTTCCTCTTATCTTGCCTTGCTTTGCC
12957_2.3_ASTPr2f.ab1      TGGCAGAAAAGAACTCCTGGACACTTCCTCTTATCTTGCCTTGCTTTGCC
12957_2.1_ASTPr2f.ab1      TGGCAGAAAAGAACTCCTGGACACTTCCTCTTATCTTGCCTTGCTTTGCC
12957_2.4_ASTPr2f.ab1      TGGCAGAAAAGAACTCCTGGACACTTCCTCTTATCTTGCCTTGCTTTGCC
*****
-753.....-704
.....SNP2.....
```

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 TCTCGTCATGTCTTGCCCTCCTGTCTGAAACCAAGGCAGGTGGCCACCCA
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 TCTCGTCATGTCTTGCCCTCCTGTCTGAAACCAAGGCAGGTGGCCACCCA
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 TCTCGTCATGTCTTGCCCTCCTGTCTGAAACCAAGGCAGGTGGCCACCCA
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 TCTCGTCATGTCTTGCCCTCCTGTCTGAAACCAAGGCAGGTGGCCACCCA

-703.....-654

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 CATTCTCTCAGGCAGAGAAGGTCAAGGTCGCCCGCGGGCTCCGGA**TC**
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 CATTCTCTCAGGCAGAGAAGGTCAAGGTCGCCCGCGGGCTCCGGA**AC**
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 CATTCTCTCAGGCAGAGAAGGTCAAGGTCGCCCGCGGGCTCCGGA**TC**
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 CATTCTCTCAGGCAGAGAAGGTCAAGGTCGCCCGCGGGCTCCGGA**AC**

***** *
-653.....-604
.....**SNP3**

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 GGCACGATTGGCAGAGGACTCCCGTCCCGAGTGCAGACGCCGATTTGGC
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 GGCACGATTGGCAGAGGACTCCCGTCCCGAGTGCAGACGCCGATTTGGC
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 GGCACGATTGGCAGAGGACTCCCGTCCCGAGTGCAGACGCCGATTTGGC
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 GGCACGATTGGCAGAGGACTCCCGTCCCGAGTGCAGACGCCGATTTGGC

-603.....-554

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 TGCTAGCCTGAGCCAGGCCAGGATGGGTTCAGGAATGTACGCACTCTGCGG
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 TGCTAGCCTGAGCCAGGCCAGGATGGGTTCAGGAATGTACGCACTCTGCGG
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 TGCTAGCCTGAGCCAGGCCAGGATGGGTTCAGGAATGTACGCACTCTGCGG
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 TGCTAGCCTGAGCCAGGCCAGGATGGGTTCAGGAATGTACGCACTCTGCGG

-553.....-504

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 CGTGGCAGCTAGAACACCAG**CT**TCTGTGGGTACC**G**GAAGGCCGGTCC**TCCG**
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 CGTGGCAGCTAGAACACCAG**T**TCTGTGGGTACC**A**GAAGGCCGGTCC**TCCG**
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 CGTGGCAGCTAGAACACCAG**CT**TCTGTGGGTACC**G**GAAGGCCGGTCC**TCCG**
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 CGTGGCAGCTAGAACACCAG**T**TCTGTGGGTACC**A**GAAGGCCGGTCC**TCCG**

***** * * * *
-503.....-454
.....**SNP4.....SNP5.....**

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 GAATTCCCGCGGGCCACCGCTGCTAATCTCTTGGCCCTTGAAGGTCGAG
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 GAATTCCCGCGGGCCACCGCTGCTAATCTCTTGGCCCTTGAAGGTCGAG
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 GAATTCCCGCGGGCCACCGCTGCTAATCTCTTGGCCCTTGAAGGTCGAG
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 GAATTCCCGCGGGCCACCGCTGCTAATCTCTTGGCCCTTGAAGGTCGAG

-453.....-404

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 GAAACCGCCTCGCGGTACGACTGCCGCTCGGCTCCTTCCTTCAGCACCGG
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 GAAACCGCCTCGCGGTACGACTGCCGCTCGGCTCCTTCCTTCAGCACCGG
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 GAAACCGCCTCGCGGTACGACTGCCGCTCGGCTCCTTCCTTCAGCACCGG
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 GAAACCGCCTCGCGGTACGACTGCCGCTCGGCTCCTTCCTTCAGCACCGG

-403.....-354

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 TAGGGCCAAGGAACAACAGCCTCAGTGATAGGAGGACGCTCTGCCAATCA
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 TAGGGCCAAGGAACAACAGCCTCAGTGATAGGAGGACGCTCTGCCAATCA
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 TAGGGCCAAGGAACAACAGCCTCAGTGATAGGAGGACGCTCTGCCAATCA
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 TAGGGCCAAGGAACAACAGCCTCAGTGATAGGAGGACGCTCTGCCAATCA

-353.....-304

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 GCCATAGACCCGCCCCATCTCGGCCGGCGTACAGTGCATTGGTTGCATCA
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 GCCATAGACCCGCCCCATCTCGGCCGGCGTACAGTGCATTGGTTGCATCA
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 GCCATAGACCCGCCCCATCTCGGCCGGCGTACAGTGCATTGGTTGCATCA
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 GCCATAGACCCGCCCCATCTCGGCCGGCGTACAGTGCATTGGTTGCATCA

-303.....-254

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 TTACCGGCCTCTGACAAGGTTCTCTTCTTGGATTGGCTAATAGCATCCCC
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 TTACCGGCCTCTGACAAGGTTCTCTTCTTGGATTGGCTAATAGCATCCCC
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 TTACCGGCCTCTGACAAGGTTCTCTTCTTGGATTGGCTAATAGCATCCCC
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 TTACCGGCCTCTGACAAGGTTCTCTTCTTGGATTGGCTAATAGCATCCCC

-253.....-204

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 TCCCTCCTGGCCTTTTTTGTTCAGAAGCTCACGATTGGTTAACAGCTTTGC
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 TCCCTCCTGGCCTTTTTTGTTCAGAAGCTCACGATTGGTTAACAGCTTTGC
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 TCCCTCCTGGCCTTTTTTGTTCAGAAGCTCACGATTGGTTAACAGCTTTGC
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 TCCCTCCTGGCCTTTTTTGTTCAGAAGCTCACGATTGGTTAACAGCTTTGC

-203.....-154

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 CAAACTCCCGACACGGCTCGACCATTGGAGGCCGTGGGCCCGCCCCGCC
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 CAAACTCCCGACACGGCTCGACCATTGGAGGCCGTGGGCCCGCCCCGCC
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 CAAACTCCCGACACGGCTCGACCATTGGAGGCCGTGGGCCCGCCCCGCC
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 CAAACTCCCGACACGGCTCGACCATTGGAGGCCGTGGGCCCGCCCCGCC

-153.....-104

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 TACTAGGTGAAGGTGAGAGTCTCCTCCAGTTGCAGCGGTTGGACGGTACC
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 TACTAGGTGAAGGTGAGAGTCTCCTCCAGTTGCAGCGGTTGGACGGTACC
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 TACTAGGTGAAGGTGAGAGTCTCCTCCAGTTGCAGCGGTTGGACGGTACC
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 TACTAGGTGAAGGTGAGAGTCTCCTCCAGTTGCAGCGGTTGGACGGTACC

-103.....-54

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 GAGCGGCTCCAGGCGCGAGGTGAAAGCTCCCGCCGACTCCTGCTCTCTA
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 GAGCGGCTCCGGGCGCGAGGTGAAAGCTCCCGCCGACTCCTGCTCTCTA
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 GAGCGGCTCCAGGCGCGAGGTGAAAGCTCCCGCCGACTCCTGCTCTCTA
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 GAGCGGCTCCGGGCGCGAGGTGAAAGCTCCCGCCGACTCCTGCTCTCTA

-53.....-4

.....SNP6.....

12957_2.2_ASTPr2f.ab1 GCTATG
12957_2.3_ASTPr2f.ab1 GCTATG
12957_2.1_ASTPr2f.ab1 GCTATG
12957_2.4_ASTPr2f.ab1 GCTATG

.....1....

4.2.2 Exon 2

Schema 4: Alignment der Exon 2-Sequenzen, F₀-Tiere, Forward-Primer

```
Mumm .seq GCTAATGACAGCAGCCTAAACCACGAGTACCTGCCCATCCTGGGCCTGGCAGAGTTCCGG
Mustang.seq GCTAATGACAGCAGCCTAAACCACGAGTACCTGCCCATCCTGGGCCTGGCAGAGTTCCGG
M689 .seq GCTAATGACAGCAGCCTAAACCACGAGTACCTGCCCATCCTGGGCCTGGCAGAGTTCCGG
M690 .seq GCTAATGACAGCAGCCTAAACCACGAGTACCTGCCCATCCTGGGCCTGGCAGAGTTCCGG
*****

Mumm .seq ACCTGTGCTTCCCGCCTTGCCCTTGGAGATGACAGCCAGCTCTTCAGGAGAAGCGG
Mustang.seq ACCTGTGCTTCCCGCCTTGCCCTTGGAGATGACAGCCAGCTCTTCAGGAGAAGCGG
M689 .seq ACCTGTGCTTCTCGTCTTGCCCTTGGAGATGACAGCCAGCTCTTCAGGAGAAGCGG
M690 .seq ACCTGTGCTTCTCGTCTTGCCCTTGGAGATGACAGCCAGCTCTTCAGGAGAAGCGG
***** ** *****

.....SNP8+9.....
```

Schema 5: Alignment der Exon 2-Sequenzen, F₀-Tiere, Reverse-Primer

```
Mumm .seq GGTCCGGA ACTCTGCCAGGCCAGGATGGGCAGGTACTCGTGGTTTAGGCTGCTGTCATT
Mustang.seq GGTCCGGA ACTCTGCCAGGCCAGGATGGGCAGGTACTCGTGGTTTAGGCTGCTGTCATT
M689 .seq GGTCCGGA ACTCTGCCAGGCCAGGATGGGCAGGTACTCGTGGTTTAGGCTGCTGTCATT
M690 .seq GGTCCGGA ACTCTGCCAGGCCAGGATGGGCAGGTACTCGTGGTTTAGGCTGCTGTCATT
*****

Mumm .seq AGCAATCCTCTGCTCCACCTTCTCACGACCGGCAAAACCCAAGGCTGGCAATCATCGG
Mustang.seq AGCAATCCTCTGCTCCACCTTCTCACGACCGGCAAAACCCAAGGCTGGCAATCATCGG
M689 .seq AGCAATCCTCTGCTCCACCTTCTCACGACTGGCAAAACCCAAGGCTGGCAATCATCGG
M690 .seq AGCAATCCTCTGCTCCACCTTCTCACGACTGGCAAAACCCAAGGCTGGCAATCATCGG
***** *****

.....SNP7.....
```

4.3 Darstellung der SNPs

Bei dem Kandidatengen *GOT1* konnten im Promotorbereich sechs SNPs nachgewiesen werden (siehe Abb. 4). In SNP1 fand sich bei Meishan, die bereits in der GenBank abgelegte Variante Cytosin, die bei Pietrain durch Guanin ersetzt war. Im SNP2 war das bei den

Meishan-Sauen vorkommende Adenin bei den Pietrain-Ebern durch Guanin ersetzt worden. Der SNP3 hat in der Meishan-Sequenz ein Thymin wohingegen bei Pietrain ein Adenin vorkam. Der SNP4 war bei der Sequenz der Pietrain-Schweine ein Thymin anstatt eines Cytosins in der Meishan-Sequenz. Der SNP5 war bei Pietrain ein Adenin anstatt eines Guanins bei den Meishan. Bei SNP6 hatten die Pietrain-Eber in ihrer Sequenz die Base Cytosin, die Meishan-Sauen ein Thymin als Base eingebaut (siehe Tab. 8).

Im Exon 2 der Aspartat Aminotransferrase waren drei Polymorphismen vorhanden. Der erste Polymorphismus (SNP7) war bei den Pietrain Ebern ein Guanin, wohingegen die Meishan-Sauen Adenin als Base eingebaut hatten. Die Pietrain Eber wiesen an SNP8 und SNP9 in der Sequenzierung ein Cytosin auf, wohingegen die Meishan-Sauen ein Thymin hatten.

Die nachgewiesenen Polymorphismen in den Exons sind stille Mutationen. Der jeweilige Basenaustausch fand bei den Triplets immer an dritter Stelle statt, so dass in diesem Fall der Aminosäureaustausch zu keinem veränderten Protein führte (siehe Tab. 9).

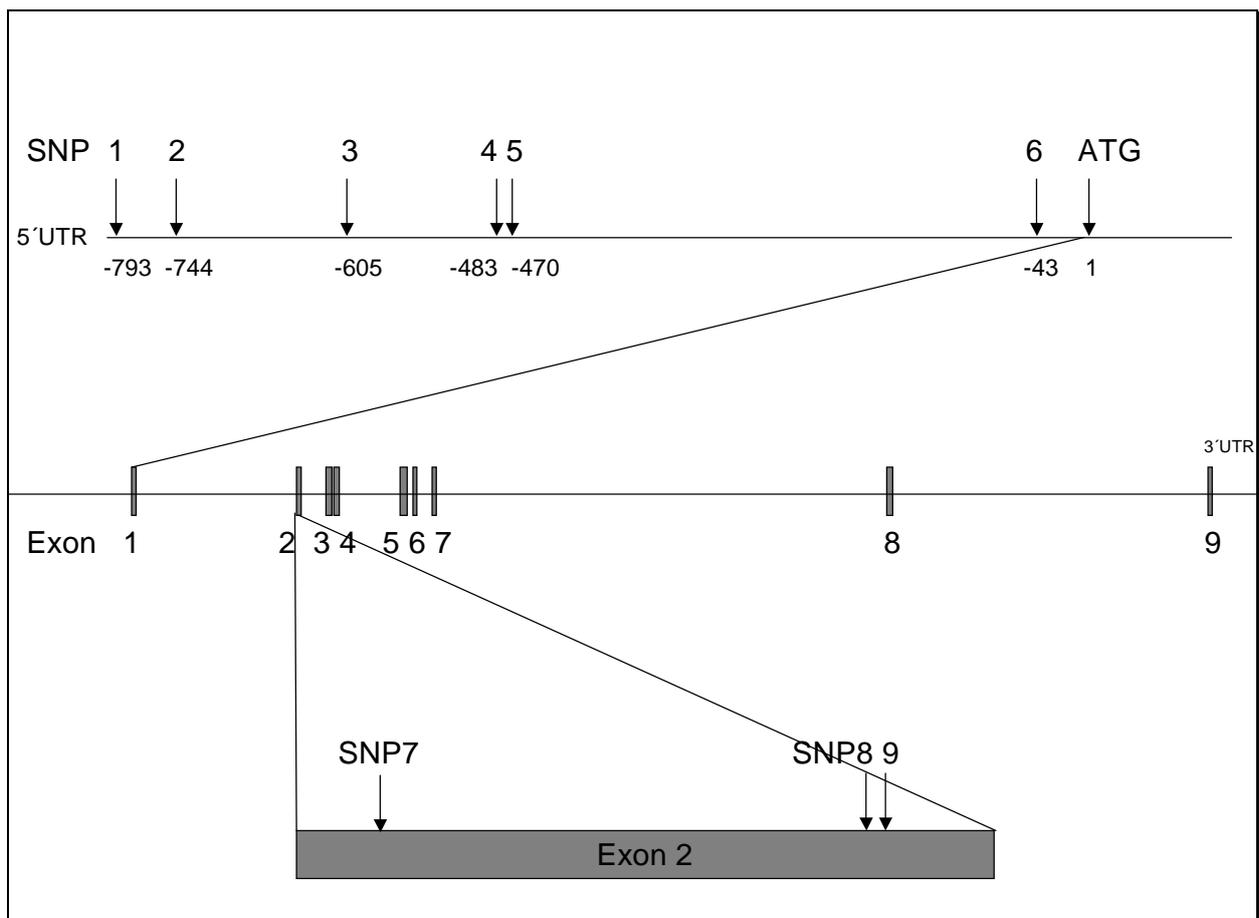


Abb. 4 SNP-Lokalisation

Tab. 8 SNP-Basenaustausch

SNP-Nr.	Offizielle Nomenklatur	Lokalisation	Basenaustausch	
			Meishan	Pietrain
1	SNP c.-793 C>G	-793C	C	G
2	SNP c.-744 A>G	-744A	A	G
3	SNP c.-605 T>A	-605T	T	A
4	SNP c.-483 C>T	-483C	C	T
5	SNP c.-470 G>A	-470G	G	A
6	SNP c.-43 A>G	-43A	A	G
7	SNP c.156 A>G	156A	A	G
8	SNP c.255 T>C	255T	T	C
9	SNP c.258 T>C	258T	T	C

Schema 6: Aminosäuresequenz von *GOT1*

MAPPSVFAEVPQAQPVLVFKLIADFREDPDPRKVNLGVGAYRTDDCQPWVLPVVRK
1.....**56**
.....**SNP7**.....

VEQRIANDSSLNHEYLPILGLAEFRTCASRLALGDDSPALQEKRGGVQSLGGTGALR
57.....**114**
.....**SNP8+9**.....

IGAEFLARWYNGTNNKDTPVYVSSPTWENHNGVFTTAGFKDIRSYRYWDTEKRGLD
115.....**170**

LQGFLSDLENAPEFSIFVLHACAHNPTGTDPTPEQWKQIASVMKRRFLFPFFDSAYQG
171.....**228**

FASGNLEKDAWAIKYFVSEGFELFCAQSFSKNFGLYNERVGNLTVVAKPDSILRVLS
229.....**286**

QMEKIVRVTWSNPPAQGARIVARTLSDPELFHEWTGNVKTMA DRILSMRSELRARL
287.....344

EALKTPGTWNHITDQIGMFSFTGLNPKQVEYLINEKHIYLLPSGRINMCGLTTKNLDY
345.....402

VATSIHEAVTKIQ
403.....

Tab. 9 Aminosäuresequenz

SNP	Meishan- Sequenz	Pietrain- Sequenz	Aminosäure
7	CCA	CCG	Prolin (P)
8	TCT	TCC	Serin (S)
9	CGT	CGC	Arginin (R)

4.4 Genotypen in der F₂- und F₀-Generation

Die Ergebnisse der Genotypenanalyse ergab eine Ungleichverteilung der Genotypen in der F₂-Generation bei SNP4 und SNP6 (siehe Tab. 10).

Tab. 10 SNP-Genotypen

SNP	bp	<i>GOT1</i> Genotypen			ME-Allele	PI-Allele
	position					
SNP1	-793	CC	CG	GG	C	G
		57.0	35.5	7.5		
SNP2	-744	AA	AG	GG	A	G
		25.0	54.3	20.7		
SNP3	-605	TT	TA	AA	T	A
		21.7	51.1	27.2		
SNP4	-483	CC	CT	TT	C	T
		24.7	75.3	0.0		
SNP5	-470	GG	GA	AA	G	A
		24.7	56.2	19.1		
SNP6	-43	AA	AC	GG	A	G
		0.0	90.2	9.8		
SNP7	+156	AA	AG	GG	A	G
		56.8	39.0	4.2		
SNP8	+255	TT	TC	CC	T	C
		31.1	61.3	7.6		
SNP9	+258	TT	TC	CC	T	C
		31.1	61.3	7.6		

4.5 Assoziationen zwischen Phänotyp (sAST Werte) und *GOT1*-SNP in der F₂-Generation

Die Assoziation zwischen den SNP-Genotypen und den sAST-Werten der F₂-Generation zeigen, dass die AST-Werte durch den Genotyp an SNP1 signifikant beeinflusst werden. Sowohl vor der Infektion (Tag 0), als auch im akuten Stadium der Sarkozystose (Tag 14 der Infektion) ist bei SNP1 eine deutliche Differenzierung zwischen den Meishan- und Pietrain-Genotypen erkennbar (siehe Tab. 11). Der logarithmierte Mittelwert der Tiere mit Meishan-Genotyp liegt deutlich über den Heterozygoten und den Tieren mit Pietrain-Genotyp (siehe Abb. 5 und 6).

Tab. 11 Assoziation zwischen AST und SNP 1 bis 9

Tag der Infektion	SNP	Genotypen	n	Log-Mittelwert	±SD	CI95l	CI95u	P
Tag 0 (keine)	1	CC	52	1.387	0.133	1.350	1.424	< 0.001
		CG	31	1.274	0.088	1.241	1.306	
		GG	7	1.230	0.202	1.043	1.417	
	2	AA	22	1.397	0.130	1.339	1.455	0.017
		AG	48	1.332	0.125	1.296	1.368	
		GG	19	1.274	0.162	1.196	1.352	
	3	TT	20	1.274	0.152	1.202	1.345	0.014
		TA	46	1.334	0.130	1.295	1.372	
		AA	23	1.396	0.127	1.341	1.451	
	4	CC	22	1.394	0.131	1.336	1.452	0.001
		CT	65	1.307	0.135	1.273	1.340	
	5	GG	22	1.394	0.131	1.336	1.452	0.03
		GA	48	1.311	0.126	1.275	1.348	
		AA	17	1.293	0.161	1.210	1.376	
	6	TC	81	1.341	0.127	1.313	1.369	0.006
		CC	9	1.210	0.168	1.081	1.339	
	7	TT	66	1.359	0.137	1.326	1.393	0.045
		TC	44	1.311	0.101	1.280	1.341	
CC		5	1.242	0.245	0.938	1.546		
8/9	TT	36	1.352	0.138	1.306	1.399	n.s.	
	TC	71	1.333	0.124	1.303	1.362		
	CC	9	1.313	0.188	1.168	1.458		
Tag 14 (akut)	1	CC	53	1.507	0.171	1.460	1.555	< 0.001
		CG	33	1.386	0.190	1.319	1.454	
		GG	7	1.307	0.121	1.195	1.419	
	2	AA	23	1.521	0.168	1.449	1.594	n.s.
		AG	50	1.427	0.202	1.370	1.484	
		GG	19	1.416	0.157	1.340	1.492	
	3	TT	20	1.436	0.154	1.364	1.508	n.s.
		TA	47	1.436	0.203	1.376	1.495	
		AA	25	1.496	0.177	1.422	1.569	
	4	CC	22	1.509	0.165	1.436	1.582	0.019
		CT	67	1.405	0.181	1.361	1.449	
	5	GG	22	1.509	0.165	1.436	1.582	0.04
		GA	50	1.392	0.192	1.337	1.446	
		AA	17	1.442	0.143	1.369	1.516	

6	TC	83	1.456	0.186	1.415	1.496	0.001
	CC	9	1.289	0.113	1.202	1.376	
7	TT	47	1.460	0.189	1.414	1.506	0.007
	TC	46	1.392	0.171	1.341	1.442	
	CC	5	1.226	0.062	1.149	1.303	
8/9	TT	37	1.439	0.199	1.372	1.505	n.s.
	TC	73	1.419	0.178	1.377	1.460	
	CC	9	1.427	0.211	1.266	1.590	

Legende: SD: Standardabweichung; CI: Konfidenzintervall (l = unteres und u = oberes), P: Signifikanzen

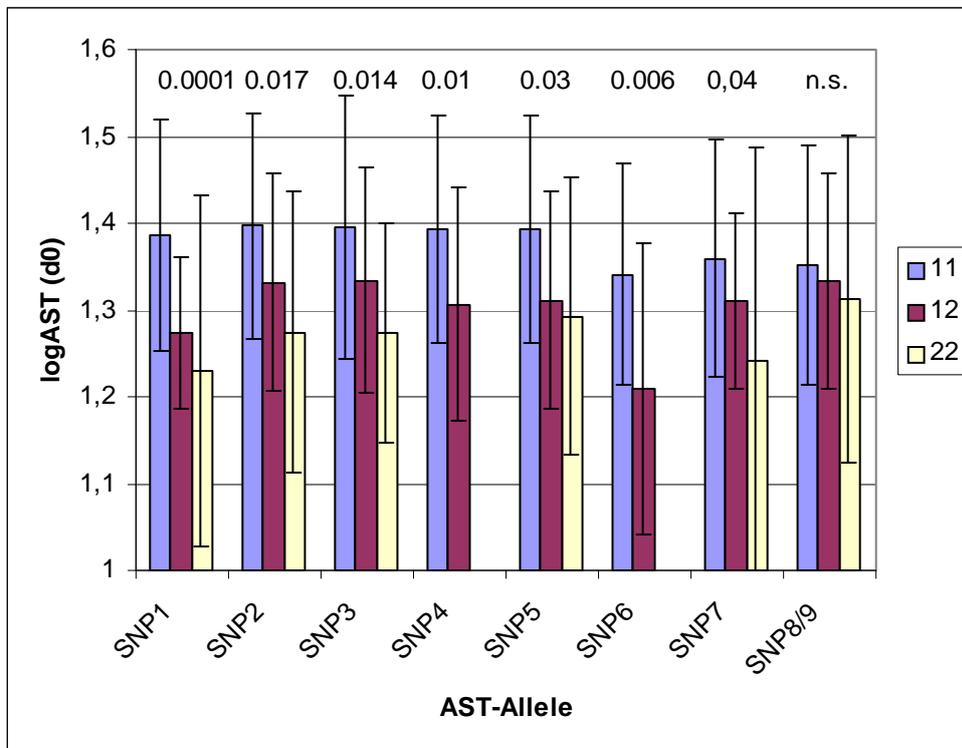


Abb. 5: Mittelwertsunterschiede und Standardabweichungen der logarithmierten AST-Werte (Tag 0 p.i.) nach Genotypen der 9 identifizierten SNPs im Promotor. SNP1: 1=C, 2=G; SNP2: 1=A, 2=G; SNP3: 1=T, 2=A; SNP4: 1=C, 2=T; SNP5: 1=G, 2=A; SNP6: 1=T, 2=C; SNP7: 1=T, 2=C; SNP8/9: 1=T, 2=C; Signifikanzen (<0,05 = signifikant; n.s.: nicht signifikant).

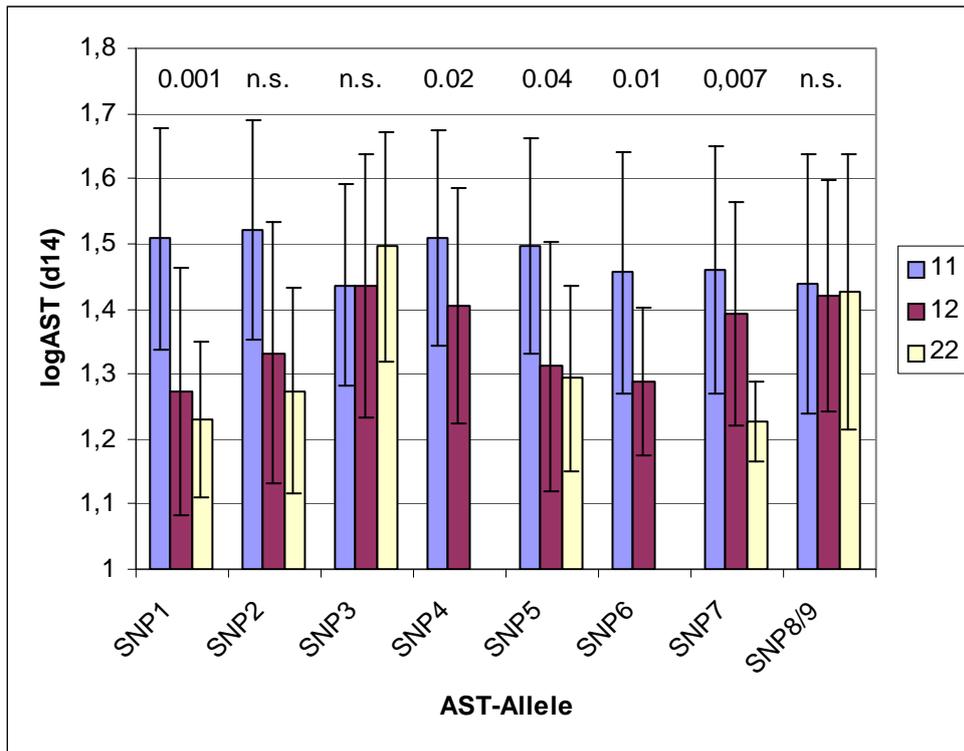


Abb. 6: Mittelwertsunterschiede und Standardabweichungen der logarithmierten AST-Werte (Tag 14 p.i. = akute Belastung) nach Genotypen der 9 identifizierten SNPs im Promotor
Legende: SNP1: 1=C, 2=G; SNP2: 1=A, 2=G; SNP3: 1=T, 2=A; SNP4: 1=C, 2=T; SNP5: 1=G, 2=A; SNP6: 1=T, 2=C; SNP7: 1=T, 2=C; SNP8/9: 1=T, 2=C; Signifikanzen (<0,05 = signifikant; n.s.: nicht signifikant).

4.6 Kartierung der *GOT1* auf SSC14

GOT1 wurde mittels Kopplungsanalyse zwischen die Marker Sw2519 and Sw761 kartiert. Der Abstand zwischen Sw2519 und *GOT1*, bzw. zwischen *GOT1* und Sw761 betrug 14 bzw. 19 cM.

4.7 QTL-Analyse

Unter Belastung der akute Sarkozystose (Tag 14 p.i.) wurde der F-Wert der QTL-Analyse von 8,4 auf 13,7 unter Berücksichtigung von SNP1 gesteigert. Mit Berücksichtigung von SNP1 stieg der F-Wert des unter physiologischen Bedingungen (Tag 0) errechneten, potentiellen QTL von 4,5 (nicht signifikant) auf genomweit signifikante 10,6 an (siehe Abb. 7 und 8). Es

lassen sich 18,52 % der Phänotypvarianz an Tag 14 und 15,22 % der Phänotypvarianz an Tag 0 durch den QTL mit Berücksichtigung von SNP1 erklären (siehe Tab. 12).

Tab. 12 QTL sortiert nach Tag der AST-Wert Messung und SNP.

Zeit- punkt d. Infektion	SNP	cM	F	P	% s	x	±SD	a	±SD _a	d	±SD _d	CI _{95l}	CI _{95u}	ΔCI
keine (Tag 0)	kein ¹	49	4.5		6.8	1.250	0.071	-0.055	0.019	-0.032	0.031	0	90	90
	1	49	10.6	***	15.2	1.275	0.067	-0.049	0.019	-0.078	0.031	40	55	15
	2	55	4.9		7.6	1.247	0.071	-0.057	0.019	-0.024	0.030	2	89	87
	3	65	4.0		6.3	1.253	0.071	-0.046	0.017	-0.021	0.024	3	83	80
	4	54	4.6		7.2	1.267	0.071	-0.045	0.024	-0.059	0.036	1	83	82
	5	56	4.7		7.2	1.254	0.071	-0.056	0.019	-0.036	0.03	4	87	83
	6	56	4.5		7.1	1.254	0.070	-0.075	0.025	-0.032	0.036	1	83	82
	7	51	9.1	***	16.3	1.241	0.068	-0.090	0.024	0.011	0.037	11	63	52
8/9	57	4.69		7.4	1.243	0.071	-0.061	0.021	-0.015	0.032	5	83	78	
Akute (Tag 14)	kein ¹	40	8.4	**	12.1	0.924	0.081	-0.091	0.022	-0.002	0.035	12	52	40
	1	42	13.7	***	18.5	0.960	0.077	-0.103	0.023	-0.035	0.037	21	55	34
	2	37	8.0	**	11.6	0.917	0.081	-0.083	0.021	0.0063	0.031	13	73	60
	3	34	7.9	**	11.4	0.926	0.081	-0.092	0.023	0.003	0.033	14	72	58
	4	38	8.0	**	11.7	0.922	0.081	-0.098	0.025	0.023	0.036	14	65	51
	5	33	7.5	**	11.1	0.923	0.081	-0.077	0.02	0.0034	0.003	14	70	56
	6	40	9.7	***	13.7	0.932	0.079	-0.122	0.029	0.013	0.042	13	56	43
	7	40	12.2	***	16.7	0.941	0.090	-0.110	0.026	-0.022	0.041	20	57	37
8/9	32	7.5	**	11.1	0.925	0.081	-0.076	0.019	0.004	0.027	10	73	63	

¹: QTL-Analyse basierend auf bekannten Mikrosatelliten ohne SNP Information; cM: Position auf dem Chromosom; F: F-Wert; P: Signifikanzen des Schwellenwertes von den F-Werten: 5.1 (P< 0.05[*]); 6.8 (P< 0.01[**]); 8.9 (P< 0,001[***]); %s: die durch den QTL erklärte Phänotypvarianz in Prozent, x: logarithmierter Mittelwert; SD: Standardabweichung, a und d: Additiv- und Dominanz-Effekte des QTL, CI: Konfidenzintervall (unteres und oberes)

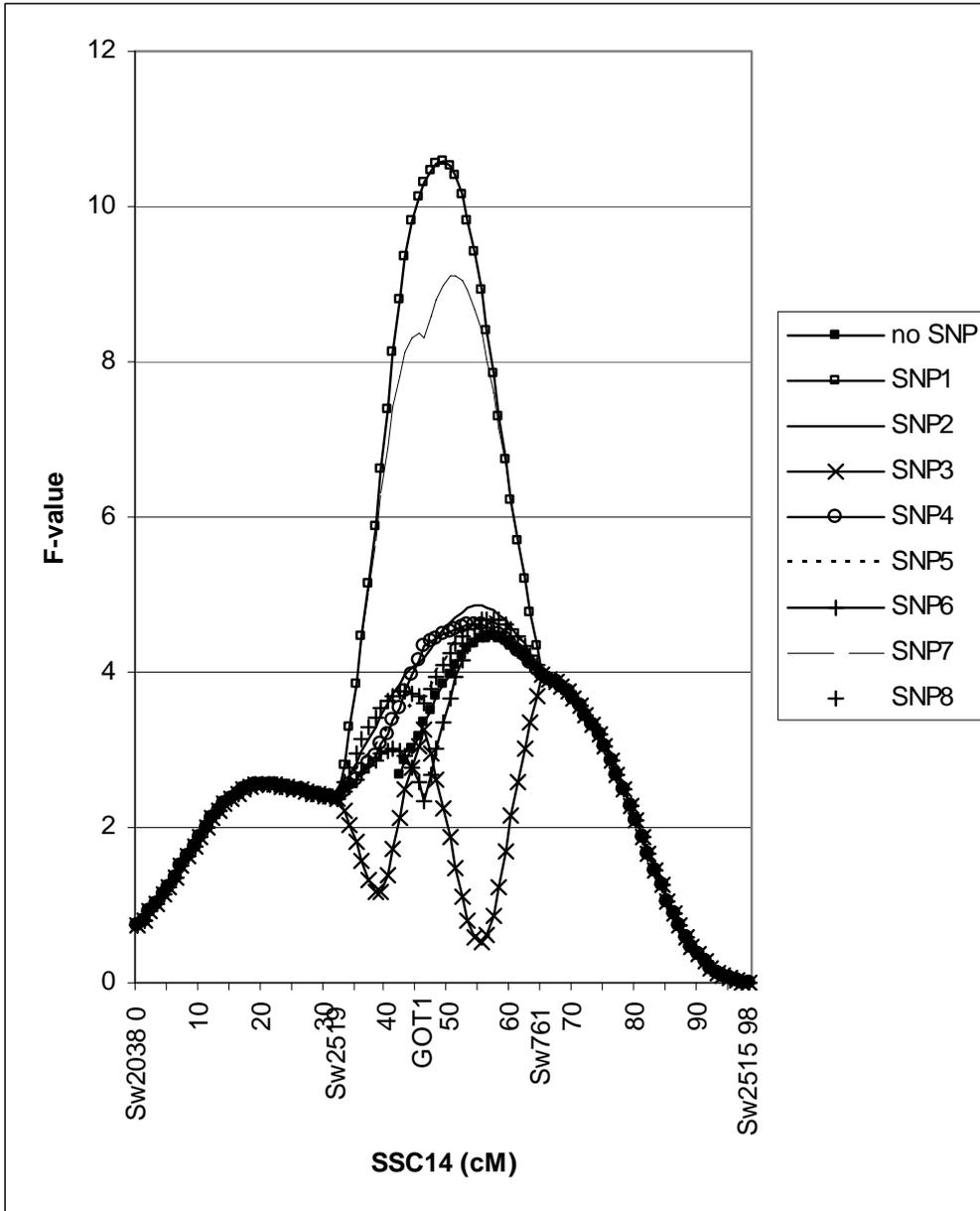


Abb. 7: QTL auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung des jeweiligen SNP aus dem *GOT1*-Gen. Die QTL beziehen sich auf die sAST-Spiegel unter physiologischen Bedingungen (Tag 0 p.i. des Sarcocystis-Infektionsversuchs).

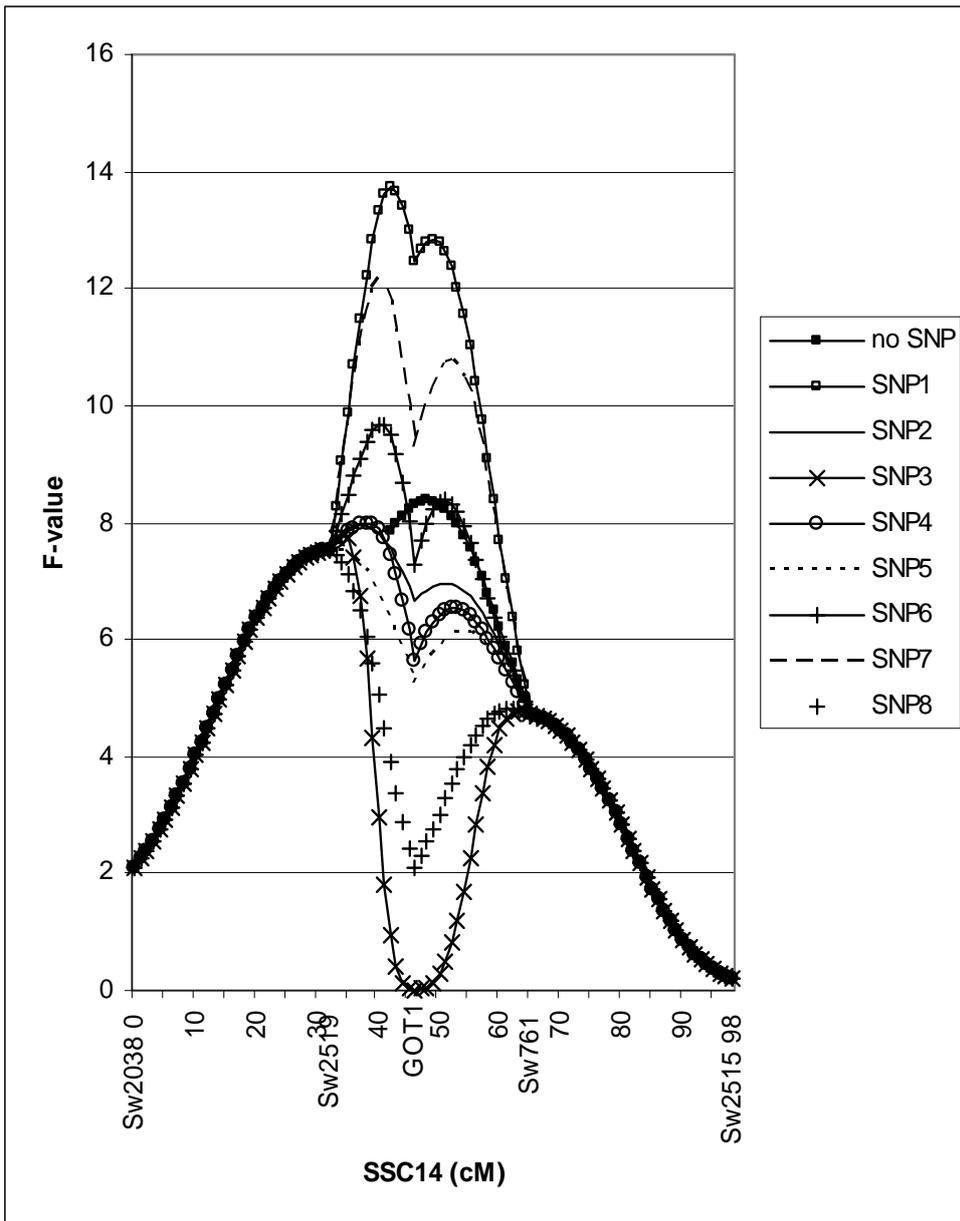


Abb. 8: QTL auf Basis der angezeigten Mikrosatelliten ohne und mit Berücksichtigung des jeweiligen SNP aus dem *GOT1*-Gen. Die QTL beziehen sich auf die sAST-Spiegel unter Belastung (Tag 14 p.i. des *Sarcocystis*-Infektionsversuchs).

Tab. 13: AllelÜbereinstimmung zwischen den SNPs (Pearson Korrelationen).

SNP	SNP7	SNP8	SNP9	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6
SNP7	1	0,56***	0,56***	0,68***	0,47***	0,35***	0,41***	0,43***	0,43***
SNP8		1	1	0,37***	0,87***	0,73***	0,78***	0,80***	0,17*
SNP9			1	0,37***	0,87***	0,73***	0,78***	0,80***	0,17
SNP1				1	0,28**	0,17	0,25*	0,27*	0,84***
SNP2					1	0,88***	0,99***	0,99***	0,2
SNP3						1	0,84***	0,84***	0,08
SNP4							1	0,99***	0,19
SNP5								1	0,21*
SNP6									1

Signifikanzen: * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001.

4.8 Auswahl der SNPs für die kommerzielle Population

SNP1 zeigte sowohl bei der Assoziationsstudie der F₂-Generation als auch für die QTL-Analyse die höchsten Signifikanzwerte. SNPs mit nur zwei vorkommenden Genotypen wurden für die weitere Analyse ausgeschlossen.

4.9 Genotypen der kommerziellen Population

In der kommerziellen Population kamen die Genotypen mit einer Verteilung von 26,8% (GG), 59,5 % (heterozygote Tiere) und 13,7% (CC) vor (siehe Tab. 14).

Tab. 14 SNP1 Genotypen der kommerziellen Population

	Genotyp	N	%
SNP1	GG	41	26,8
	GC	91	59,5
	CC	21	13,7

4.10 Assoziation zwischen Phänotyp (sAST-Wert) und *GOT1*-Genotyp in der kommerziellen Population

In der kommerziellen Population konnte eine signifikante Assoziation der Genotypen mit dem AST-Wert festgestellt werden. Genotyp CC war mit einem niedrigeren sAST-Wert assoziiert als Genotyp GG (siehe Tab. 16 und Abb. 9 und 10).

Tab. 15 Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp in der kommerziellen Population.

SNP1 Genotype	log sAST (Mittelwert)	±SE	CI _{95l}	CI _{95u}	P
CC	1.450	0.028	1.395	1.505	0.009
CG	1.516	0.012	1.492	1.540	
GG	1.540	0.019	1.502	1.577	

Legende: SD: Standardabweichung; CI: Konfidenzintervall (l = unteres und u = oberes), P: Signifikanz.

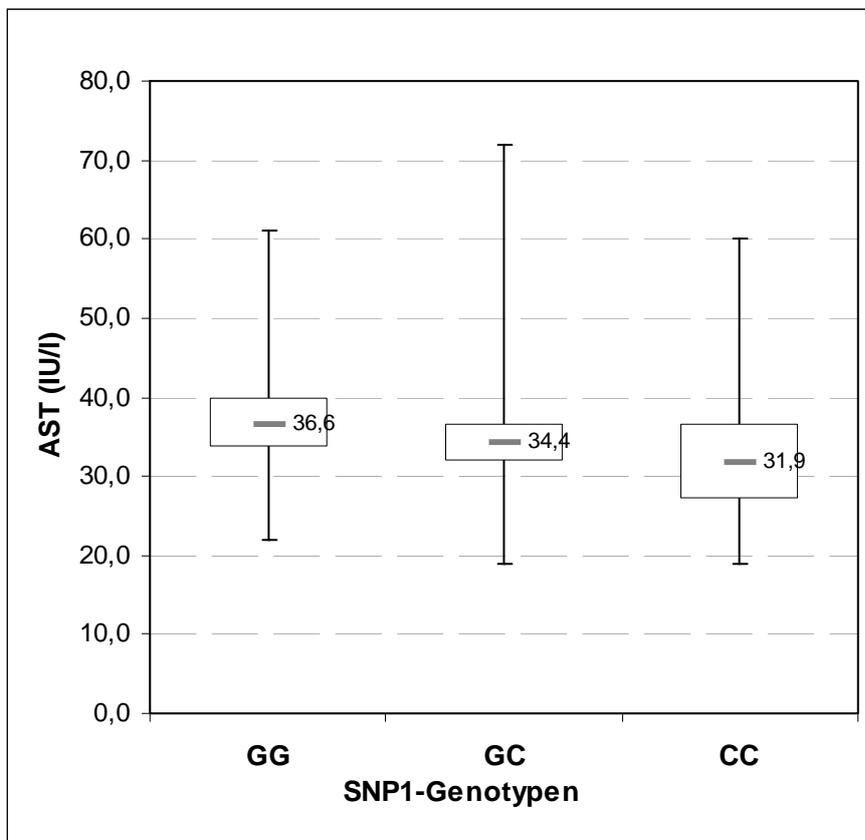


Abb. 9: Mittelwerte, Standardabweichungen und 95% Konfidenzintervall der sAST-Werte innerhalb der SNP1-Genotypen in der kommerziellen Population.

Tab. 16 Tierverteilung in der kommerziellen Population

	Genotyp CC	%	Genotyp CG	%	Genotyp GG	%	Gesamt
Tiere mit AST-Werten im Normbereich	14	66,6	50	54,9	22	53,66	86
Tiere mit AST-Werten im pathologischen Bereich	7	33,3	41	45,1	19	46,34	67

5 Diskussion

5.1 AST als Gesundheitsparameter

Die Aufklärung von Erreger-Wirts-Interaktionen sowie von Pathogenese- und Abwehrmechanismen auf molekularer Basis steht derzeit im Fokus Human-, Veterinärmedizinischer und tierzuchtwissenschaftlicher Forschung. Die Hoffnung liegt zum einen darin diese Mechanismen besser verstehen zu lernen und dieses Verständnis dann gezielt für neue Prophylaxe- und Therapieansätze nutzen zu können. Zum andern könnten solche Erkenntnisse langfristig zu Markern führen, mit deren Hilfe durch markergestützte oder genomische Selektion resistenter Tierpopulationen erzeugt werden könnten (Hoeltig et al., 2009). Obwohl bislang für praktisch alle Erreger-Wirts-Interaktionen der wichtigsten Nutztierspezies genetisch fundierte Populationsunterschiede publiziert wurden (Übersicht s. Reiner, 2006), ist die Zahl der bekannten und praktisch nutzbaren Genvarianten noch sehr überschaubar.

Doch die Gesundheit der Nutztiere und deren genetische Variabilität werden nicht nur durch Gene bestimmt, die sich direkt auf die Infektions-Effizienz von Krankheitserregern und die Entstehung von Infektionskrankheiten auswirken. Auch Gene, die in irgendeiner Weise zur Verbesserung der allgemeinen Resistenz- und Konstitutionslage von Tieren beitragen, sind von großer Bedeutung für die Gesundheit von Individuen und Populationen. Daher ist es zum Erreichen des gesteckten Ziels, resistenterer und gesünderer Nutztierpopulationen, von großer Bedeutung das gesamte Netzwerk potentiell beteiligter Gene und derer Varianten aufzuschlüsseln und zu verstehen. Es geht letztlich um die genetische Architektur immunologischer, klinischer und klinisch-chemischer Merkmale.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Entschlüsselung der genetischen Basis der Variabilität klinisch-chemischer Merkmale am Beispiel der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, *GOT1* zu leisten. Die *GOT1* wurde ausgewählt, weil in Vorversuchen ein QTL für die Serumaktivität der Aspartat-Aminotransferase (sAST) im chromosomalen Bereich des für die Aspartat-Aminotransferase kodierenden Gens, der *GOT1*, kartiert werden konnte (Reiner et al., 2009). Der Zusammenhang sprach für den cis-Character des QTL. Die *GOT1* erfüllte somit gleichzeitig die Anforderungen eines homolog-physiologischen und positionellen Kandidatengens.

Die sAST ist als klinisch-chemischer Parameter in zweifacher Hinsicht von großer Bedeutung. Das Enzym AST spielt eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel und ist an zentralen Kreisläufen wie dem Malat-Aspartat-Shuttle beteiligt (Lia et al., 1995; Massad et

al., 2000). Außerdem ist die sAST ein zentraler Parameter für die Diagnostik von Leber- und Muskelschäden. Ihre Aktivität im Serum steigt bei Nekrosen und Membrandefekten der entsprechenden Zellen deutlich an. Beim Schwein führten solche Untersuchungen zum Nachweis auffälliger Unterschiede zwischen Vertretern verschiedener Rassen (Heinritzi & Kixmüller, 2004), die eine genetische Ursache zumindest als Teilerklärung zulassen. Untersuchungen von Reiner et al. (2007) belegen die Heritabilität der sAST Variation. Die Kartierung eines QTL für sAST im Bereich des verantwortlichen Gens in Vorversuchen zu dieser Arbeit, führten dann zur Postulierung von Genvarianten im Bereich der *GOT1* mit steigendem bzw. abschwächendem Effekt (Reiner et al., 2009). Obwohl die mRNA-Sequenz der *GOT1* bereits früh etabliert wurde (Nagashima et al., 1989), liegen bislang kaum Informationen zu deren Variabilität vor. Solche Hinweise fehlen beim Schwein völlig. Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst nach Polymorphismen in der *GOT1* des Schweins gesucht und deren Assoziation mit der sAST untersucht werden.

5.2 Gensequenz der *GOT1* beim Schwein

Die Sequenz der *GOT1* wurde nur für wenige Spezies publiziert (Obaru et al., 1988). Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit war bezüglich der porcinen *GOT1* lediglich die Sequenz der mRNA bekannt (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/396967). Genvarianten waren weder beim Schwein noch beim Menschen beschrieben (Wang et al. 1999). Auch Sequenzen aus Promotorbereichen lagen fürs Schwein noch nicht vor. Sie wurden mit Hilfe der BAC-Sequenz CH-242-276N12 (Pre ensemble! <http://pre.ensembl.org>) und eines vergleichenden Alignments der mRNA (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) erarbeitet. Obwohl beim Schwein keine Funktionselemente im Promotor der *GOT1* beschrieben wurden, kann doch vermutet werden, dass Genvarianten in diesem Bereich die Expression der AST und damit deren Gesamtaktivität im Innern der Zelle sowie nach Freisetzung, im Serum beeinflussen könnten. Die Sequenzanalyse bestätigte, dass es sich bei der *GOT1* auch beim Schwein um ein Haushaltsgen handelt (Garlatti et al., 1993), denn auch hier fehlt die typische Sequenz einer TATA-Box. Allerdings fand sich eine GC reiche Transkriptionsstartsequenz 104 bp oberhalb des Startcodons, die typischerweise bei Haushaltsgenen gefunden wird (Aggerbeck et al., 1993). Beide Befunde zusammen sprechen für eine "Mischfunktion" der *GOT1* als ein Gen mit Grundexpression und anpassbarer Expression. Die Funktionselemente des *GOT1* Promotors sind bei der Ratte am besten beschrieben (Garlatti et al. 1993). Die

Aktivität der *GOT1* wird hier durch Glucocorticoide, Glucagon über die Sequenzmotive GRE (Glucocorticoid responsive element), CCAAT und GC reguliert (Pave-Preux et al. 1988). Der Vergleich der Promotorsequenzen von Ratte und Schwein ergab allerdings keinerlei Übereinstimmung in diesen Bereichen. Promotorstudien für das Schwein wurden bislang nicht durchgeführt.

5.3 SNPs

Das Screening nach Genvarianten zwischen Pietrain und Meishan mittels vergleichender Sequenzierung führte zur Darstellung von neun SNPs. Hiervon liegen sechs innerhalb des Promotors und drei im Bereich von Exon 2. Keiner der vorgefundenen SNPs liegt im Bereich eines Sequenzmotifs mit bekannter Funktion. Allerdings kann bislang auch nicht ausgeschlossen werden, dass die betreffenden SNPs nicht zu bislang unbekanntem Funktionsunterschieden führen könnten. Funktionelle Promotorstudien konnten allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Bei den SNPs in Exon 2 handelt es sich um stille Mutationen, die keinen Einfluss auf Qualität oder Quantität der sAST nehmen können, und damit lediglich um anonyme Marker, die keiner Funktion zugeordnet werden können.

Alle in der F₀-Generation gefundenen SNPs wurden sowohl in den F₂-Tieren als auch in der kommerziellen Population mittels Pyrosequenzierung untersucht. Diese Methode ist für die Analyse des Genotyps bei großen Tierzahlen optimal geeignet (Ahmadian et al., 2005). SNP4 und SNP6 sind in den weiterführenden Untersuchungen nicht analysiert worden, da keine geeignete Verteilung vorlag.

5.4 QTL-Analyse

Im Rahmen der Vorversuche konnte mit Hilfe flankierender Mikrosatelliten ein QTL für sAST im Bereich der *GOT1* kartiert werden. Die Effekte dieses QTL blieben allerdings unter physiologischen Bedingungen (Tag 0 der Sarcocystis-Infektion) verborgen und traten erst unter Belastung der Tiere während der akuten Sarkozystose (Tag 14 p.i.) auf. Es spricht vieles dafür, dass der Abstand der flankierenden Marker zum QTN zu groß war, um die Kopplung mit den geringen sAST-Unterschieden zu entdecken. Erst die Schädigung der Parenchyme

durch die 2. Schizogonie der Sarkozystose führte zur Freisetzung von AST-Mengen ins Serum, die eine Differenzierung zuließ. Mit Einbeziehung der SNP-Informationen (2 von 9) aus der *GOT1* in der vorliegenden Arbeit konnte die Genauigkeit der Genotypen am QTL erheblich gesteigert werden, sodass nun auch die sAST-Werte unter physiologischen Bedingungen eine signifikante Assoziation mit dem QTL aufwiesen. Das Konfidenzintervall des QTL wurde (bei gleicher Tierzahl) deutlich, von 40 auf 15 cM reduziert. Insgesamt bleibt hervorzuheben, dass es mit Hilfe der Belastung des Stoffwechsels durch die Erkrankung gelang, einen QTL sichtbar zu machen (Vorversuch, Tag 14), der zunächst (Tag 0) aufgrund der eingeschränkten Differenz zwischen den Ausgangsrassen und wegen des großen Abstands zu den Mikrosatellitenmarkern und der aufgrund tierschützerischer Überlegungen relativ geringen Tierzahlen verborgen blieb. Die Einbeziehung neu entwickelter SNPs aus dem unter Belastung abgeleiteten positionellen Kandidatengen erlaubte eine schärfere Darstellung der QTL-Effekte, auch unter physiologischen Bedingungen.

5.5 Assoziationsstudie

Die Assoziationsstudie der F₂-Generation zeigt einen signifikanten Einfluss der Genotypen auf die sAST-Werte. Der Genotyp CC ist in der F₂-Generation assoziiert mit signifikant höheren sAST-Werten. Der Genotyp GG ist in der F₂-Generation assoziiert mit niedrigen sAST-Werten. Auf Basis der QTL-Analyse ergibt sich hieraus die Hypothese, dass *GOT1* nicht nur das Kandidatengen für sAST, sondern zugleich SNP1 den zugehörigen QTN darstellen könnte. Der zweite Teil dieser Hypothese muss allerdings bei Hinzuziehen der Assoziationsstudie der kommerziellen Population verworfen werden, denn hier ist bei ebenfalls bestehender Signifikanz der Effekt genau umgekehrt. Die Kopplungsphasen in der F₂-Familie und in der kommerziellen Population sind verschoben.

Folgen der gewonnenen Erkenntnisse:

Die Verbesserung des QTL durch Einsatz der SNP-Informationen aus *GOT1* unterstreicht die signifikante Bedeutung von *GOT1* als Kandidatengen für sAST. Hieraus ergibt sich eine wesentliche Erkenntnis: Wenn *GOT1* für den sAST-QTL verantwortlich ist (was mit der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich geworden ist, allerdings noch nicht als bestätigt angesehen werden kann), und wenn man davon ausgeht, dass die *GOT1* keinen Einfluss auf

die Stabilität der Zellmembran haben kann, dann wird klar, dass die phänotypische Variabilität klinisch-chemisch gemessener sAST-Spiegel nicht nur durch unterschiedliche Grade an Membrandissoziation, sondern eventuell auch durch unterschiedliche Gehalte oder Aktivitäten an AST in den Zellen verursacht werden könnte. Die Zunahme der Eignung der untersuchten SNPs von Exon 1 in 5' Richtung spricht dafür, dass der eigentliche QTN in dieser Richtung zu finden sein dürfte. Auf Basis dieser Vermutung kann geschlussfolgert werden, dass die bereits in der intakten Zelle variierende AST-Aktivität über eine Genvariante im Promotorbereich und damit über die Variation der Genexpression der *GOT1* verursacht sein könnte. Zur Bestätigung dieser Vermutung bedarf es allerdings noch weiterer Folgeuntersuchungen im Rahmen zukünftiger Arbeiten. Problematisch wird der angedachte Zusammenhang wenn man bedenkt, dass eine höhere sAST-Aktivität, wenn sie durch erhöhte AST-Gehalte in den Zellen zustande käme, aufgrund der fördernden Funktion der AST im Zellstoffwechsel tendenziell als eher günstig angesehen werden müsste. Es ist zu erwarten, dass die Effekte dissoziierter Membranen bei weitem deutlichere Auswirkungen auf die sAST zeigen dürften als die durch Expressionsunterschiede begründeten. Dennoch belegen die vorliegenden Untersuchungen zusammen mit den bereits bekannten Rassen und Populationsunterschieden der sAST beim Schwein (Merk 1992; Kraft et al., 1999; Kixmüller 2004), dass sAST-Grenzwerte nicht pauschal und unkritisch angewandt werden dürfen.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Basis der Variabilität klinisch-chemischer Merkmale am Beispiel der Serum-AST (sAST) zu leisten. Die signifikante Variation der sAST bei verschiedenen Rassen ist hinreichend bekannt und kann bei Nichtbeachtung zu diagnostischen Fehlinterpretationen führen. Die Ursache für diese Variation ist allerdings unklar; vermutet werden Unterschiede in der Freisetzungskinetik des Enzyms aus geschädigten Zellen. In einem Vorversuch zu vorliegender Arbeit wurde ein QTL für sAST im Bereich des verantwortlichen Gens (der *GOT1*) kartiert. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die Variation der sAST zumindest teilweise auf der qualitativen oder quantitativen Wirkung des Gens selbst beruhen könnte, basierend auf begünstigenden oder hemmenden Genvarianten. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Variabilität der *GOT1* auf Sequenzebene zu untersuchen und Assoziationen zwischen Genvarianten und sAST-Spiegeln herzustellen, um den Kandidatengenstatus der *GOT1* für sAST zu bestätigen und Hinweise auf das für den QTL verantwortliche Nukleotid (QTN) zu erhalten. Da weder die gesamte Sequenz der porcinen *GOT1* noch Genvarianten bekannt waren, wurden diese zunächst durch vergleichende Sequenzierung an DNA der Rassen Pietrain und Meishan erarbeitet. Von neun identifizierten SNPs wurden drei im Bereich von Exon 2 und die übrigen im Bereich des Promotors lokalisiert. Für jeden der SNPs wurde ein Screening-Verfahren mittels Pyrosequenzierung etabliert und auf die F₂-Tiere einer gut charakterisierten Pietrain-Meishan-Familie sowie auf eine kommerzielle Kohorte (Jungsauen DLxDE) angewandt. Zwei der SNPs führten zu einer signifikanten Verbesserung des QTL. Das Konfidenzintervall des QTL wurde erheblich reduziert. Die Assoziation der 139 Tiere der F₂-Generation ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen SNP1-Genotyp und sAST-Werten (CC (Meishan), hohe sAST-Werte; GG (Pietrain), niedrige sAST-Werte). In der ausgezüchteten, kommerziellen Population von 153 Hybridsauen zeigte sich diese Assoziation ebenfalls signifikant, allerdings mit umgekehrter Kopplung. Die vorliegende Arbeit untermauert damit den Kandidatengenstatus der *GOT1* für die Variabilität der sAST Werte. Die etablierten SNPs können jedoch aufgrund der Diskrepanz der Ergebnisse der F₂-Population und der kommerziellen Population als QTN-Kandidaten ausgeschlossen werden. Die Einflüsse der SNPs auf den QTL sprechen dafür, dass das verantwortliche QTN noch weiter 5' zu suchen ist. Die Ergebnisse untermauern außerdem die Komplexität der Serum-Diagnostik und die Notwendigkeit, die gefundenen genetischen Einflüsse in Folgeuntersuchungen zu untermauern. Die vorliegende Arbeit zeigt neue Einblicke in die Architektur klinisch-

chemischer Merkmale. Sie zeigt Hinweise auf komplexe molekulare Zusammenhänge, die erst allmählich verstanden werden, und die mithelfen können, die Entstehung und die Variabilität klinisch-chemischer Merkmale zukünftig zielgerichteter und verlässlicher interpretieren und einsetzen zu können.

7 Summary

Aim of the present study was to elucidate the molecular basis of the variation of clinical-chemical traits using the example of AST. The significant variation of serum AST (sAST) between different breeds is already known and has to be considered during the interpretation of clinical test. The reason for the variation is not known but it can be supposed that there are differences in the kinetic of enzyme release of damaged cells. In the preliminary data for this study there is a QTL for sAST in the area of the corresponding gen (*GOT1*) mapped. From this we concluded, that there is the possibility that the variation of sAST is partial based on qualitative or quantitative effects of the gen itself based on promotive or inhibitory genvariations. Aim of the research was therefore to examine the variability of *GOT1* on sequence level and to search for associations between genvariants and levels of sAST to confirm the candidate-status of *GOT1* for sAST and to further localize the nucleotide, that is responsible for the QTL (QTN). But neither the sequence of the porcine *GOT1* nor variations of it were known. We established the sequence and discovered SNPs of it through the comparison of the sequenced DNA of the Meishan and Pietrain breed. Nine SNPs were identified, three of them in the area of Exon 2 and the others in the area of the promoter. For each SNP we established a screening method (Pyrosequencing) and analyzed the F₂-Generation of the well-described Pietrain-Meishan-Family and a commercial cohort (gilt German Landrace x German Edelschwein). Two SNPs produced a significant improvement of the QTL and resulted in a significant reduction of the confidence interval for the QTL. There was a significant association between SNP1-Genotype and sAST-Levels in the 139 animal of the F₂-generation (CC(Meishan) results in high AST-levels, GG(Pietrain) low AST-levels). In the commercial population of the 153 hybrid-sows SNP1 was also significantly associated with sAST-levels but with changed phase. This work verifies the relevance of *GOT1* as a candidate-gene for the variance of the sAST-level. The newly established SNP has to be excluded as possible QTN-candidate due to the conflicting results in the Pietrain-Meishan family and the commercial population. Because of the influence of the SNP on the QTL it can be concluded that the relevant QTN is located in 5' direction. This results elaborate the complexity of serum diagnostic and further underline the need for research on this topic. The present study gives new insights into the architecture of clinical-chemical traits in pigs and develops a first understanding of the genetic background.

8 Literaturverzeichnis

Aggerbeck, M., Garlatti, M., Feilleu-Duche, S., Veyssier, C., Daheshia, M., Hanoune, J., Barouki, R., (1993): Regulation of the cytosolic aspartate aminotransferase housekeeping gene promoter by glucocorticoids, cAMP and insulin. *Biochemistry* 32, 9065-72

Ahmadian, A., M. Ehn, S. Hober (2005): Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta* 363, 83-94

Archambault, J., Friesen, J. D., (1993): Genetics of eukaryotic RNA polymerase I, II and III. *Microbiol. Rev.* Sept. 57, 73-24

Barouki, R., Pave-Preux, M., Bousquet-Lemercier, B., Pol, S., Bouguet, J., Hanoune, J., (1989): Regulation of cytosolic aspartate aminotransferase mRNAs in the FAO rat hepatoma cell line by dexamethasone, insulin and cyclic AMP. *Europ. J. Biochemistry* 186, 79-85

Barrows, P. L., Prestwood, A., Green, C. E., (1982): Experimental *Sarcocystis suis* infections: disease in growing pigs. *Am. J. Vet. Res.* 43, 1409-1412

Baylis, M. & Goldmann, W., (2004): The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr. Mol. Med.* 4, 385-96

Beh, K. J., Hulme, D. J., Callaghan, M. J., Leish, Z., Lenana, I., Windon, R. H., Maddox, J.F., (2002): A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Anim. Genet.* 33; 97-106

Berge, T., (2008): Genomweite Kartierung von QTL mit Assoziation zur Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber *Sarcocystis miescheriana* beim Schwein. *Vet. Med. Diss., Giessen*

Bickhardt, K. (2001): Muskelerkrankungen, In: Waldmann K. H., M. Wendt (Hrsg): *Lehrbuch Schweinekrankheiten*, Parey, 239-259

Biedermann, G., Jatsch, C., Peschke, W., Lindner, J-P., Wittmann, W., (2000): Mast- und Schlachtleistung sowie Fleisch- und Fettqualität von Pietrain-Schweinen unterschiedlichen MHS-Genotyps und Geschlecht. Arch. Tierz. Dummerdorf 43, 151-164

Blackwell, J. M., (1996): Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infections and autoimmune disease susceptibility. Mol. Med. Today 2, 205-211

Boyd, J.W. (1983): The mechanism relating to increases in plasma enzyme and isoenzymes in diseases of animals, Vet. Clin. Path. 12, 9-14

Brade, W.(2003): Neuere Erkenntnisse zur Domestikation und Genetik der Rinder. Tierärztl. Umschau. 58, 241-251

Christen, P., Graf-Hausner, U., Bossa, F., Doonan, S., (1985), Transaminases, 173-185

Cameron, H. S., Hughes, E. H., Gregory, P. W., (1942): Genetic Resistance to Brucellosis in swine. J. Anim. Sci. 1, 106-110

Cole, R.K.,(1968): Studies on genetic resistance to Marek's disease. Avian Dis. 12, 9-28

Daetwyler, H. D., Schenkel, F. S., Sargolzaei, M., Robinson, J. A., (2008): A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. J. Dairy Sci. 91, 3225-36

Damriyasa, I., (2001): Querschnittsstudie zu Parasitosen bei Zuchtsauen in südhessischen Betrieben. Vet. Med. Diss. Justus-Liebig-Universität, Giessen

Darvasi, A., Weinreb, A., Minke, V., Weller, J., Soller, M.(1993): Detecting Marker-QTL Linkage and Estimating QTL Gene Effect and Map Location Using a Saturated Genetic Map. Genetics 134, 943-951

Daugshies, A., Rommel, M., Hoppen, H.-O., (1989): Prostanoids during acute sarcosystiosis in growing pigs. Paras. Res. 76, 2

Davies, G., Stear, M. J., Benothman, M., Abuagob, O., Kerr, A., Mitchell, S., Bishop, S. C., (2006): Quantitative trait loci associated with parasite infection in Scottish blackface sheep. *Heredity* 93, 252-258

Dekkers, J.C., (2004): Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82, 313-328

Di Bernardo, M., Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Webb, E., Sellik, G., Wild, R., Sullivan, K., Vijayakrishnan, K., Wang, Y., Pittman, A., Sunter, N.J., (2008): A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 40, 1204-10

Diez-Tascon, C., Keane, O. M., Wilson, T., Zadissa, A., Hyndman, D., Baird, D., McEvan, J., Crawford, A., (2005): Microarray analysis of selection lines from outbred populations to identify genes involved with nematode parasite resistance in sheep. *Physiol. Genomics* 21, 59-69

Drögemüller, C., Rossi, M., Gentile, A., Testoni, S., Jörg, H., Stranzinger, G., Drögemüller, M., Glowatzki-Mullis, M., Leeb, T., (2008): Arachnomelia in Brown Swiss cattle maps to chromosome 5. *Mamm. Genome* 20, 53-59

Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J.D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhardt A. H., Abraham, C., (2006): A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-3

Eckert, J., Friedhoff, K. T., Zahner, H., Deplazes, P., (2005): Familie Sarcocystidae. In: *Lehrbuch der Parasitologie der Tiermedizin*, Enke Verlag, 85-90

Edfors-Lilja, I., Wattrang, E., Marklund, L., Moller, M., Andersson-Eklung, L., Andersson, L., Fossum C., (1998) Mapping Quantitative Trait Loci for immune capacity in the pig. *J. Imm.* 160, 829-35

Erber, M., Geisel, O., (1979): Untersuchungen zur Klinik und Pathologie der Sarcocystis-suicanis-Infektion beim Schwein. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 91, 197-202

Falconer, D. S., Mackay, T. F. C., (1996): Introduction to Quantitative Genetics. Longman, Harlowe

Friendship, R.M., S.C. Henry (1992): Cardiovascular System, Haematology and clinical chemistry, In: Leman, A.D. , B.E. Straw, D.J. Taylor (Eds): Diseases of swine, Iowa State University Press, 3-11

Fresen, C (2008): Epidemiologische Studie zur Verbreitung porciner respiratorischer Krankheitserreger beim Wildschwein in Deutschland. Vet.Med.Diss., Giessen

Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., O'Brien, P. J., MacLennan, D. H., (1991): Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hypertermia. Science 26, 448-51

Garlatti, M., Tchesnokov, V., Daheshia, M., Feilleux-Duche, S., Hanoune, J., Aggerbeck, M., Barouki, R., (1993): CCAAT/Enhancer-binding Protein-related Proteins Bind to the Unusual Promotor of the Aspartate Aminotransferase Housekeeping Gene. J. Biol. Chem., 268, 6567-6574

Geldermann, H., (1975): Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. 1. Methods. Theor. Appl. Genetics. 46, 319-330

Geldermann, H., (2005): Genomanalyse sowie Gendiagnostische Verfahren, In: Tier-biotechnologie, Eugen Ulmer, 86-88

Glawischnig, E., K. Schlerka, W. Baumgartner (1977): Arbeitswerte in der Laboratoriumsdiagnostik beim Schwein, Wien. Tierärztl. Mschr. 64, 341-346

Goertz, J., Baes, C., Weimann, C., Reinsch, N., Erhardt, G., (2009): Association between single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and somatic cell score in Holstein dairy cattle. J. Dairy Sci. 92, 4018-22

Halbur, P. G., Paul, P. S., Meng, X. J., Lum, M. A., Andrews, J. J., Bruna, D. J., (1998): Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire, and Meishan pigs to infection with a high virulence strain (VR 2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J. Anim. Breed. Genet.* 115, 181-189

Harapin, I., Bedrica, L., Hahn, V., Sostaric, B., Gracner, D., (2003): Haematological and biochemical values in blood of wild boar. *Veterinarski Arhiv* 73, 333-343

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

Harhay, G. P., Sonstegard, T. S., Keele, J. W., Heaton, M.P., Clawson, M. L., Snelling, W. M., Wiedmann, R.T., Van Tassel, C. P., Smith, T. P., (2005): Characterization of 954 bovine full CDS cDNA sequences. *BMC Genomics* 6, 166

Heinritzi, K., Plonait, H. (2001): Blutkrankheiten, In : Waldman K.H., M. Wendt (Hsg.): *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*, Parey, 169-196

Hepp, S. (2006): Phänotypische und genetische Parameter ausgewählter klinischer und klinisch-chemischer Merkmale zur Charakterisierung der Resistenz gegenüber *Sarcocystis miescheriana* im F₂-Modell beim Schwein. *Vet.Med.Diss.*, Giessen

Hoeltig, D., Henning-Pauka, J., Thies, K., Rehm, T., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., Gerlach, G. F., Waldmann, K-H. and Fugato-consortium IRAS (2009): A novel Respiratory Health Score (RHS) supports a role of acute lung damage and pig breed in the course of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *BMC Vet. Res.* 5, 14

Hong, Y. H., Kim, E. S., Lillehoj, H. S., Song, K. D., (2009): Association of resistance to avian coccidiosis with single nucleotide polymorphisms in the zyxin gene. *Poultry Sci.* 88, 511-518

Horio, Y., Fukui, H., Taketoshi, M., Tanaka, T., Wada, H., (1988): Induction of cytosolic aspartate aminotransferase by glucagon in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 153, 410-16

Hospital, F., Chevalet, C., Mulsant, P., (1992): Using Markers in Gene Introgression Breeding Programms. *Genetics* 132, 1199-1210

Ibeagha-Avemue, E. M., Kgwatalala, P., Zhao, X., (2008): A critical analysis of production associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep and pig. *Mamm. Genome*, 19, 591-617

Jackson, M.L., (2007): Fluids, electrolytes, and acid-base balance. *Vet. Clin. Path.*, 171-93

Joling, P., Mok, K.S., deVries Reiling, G., Wever, P.J., Cornelis, R.S., Oskam J.K., Henken, A.M., (1993): An evaluation of immune competence in different swine breeds. *Vet. Q.* 15, 8-15

Jorgenson, C.B., Cirera, S., Archibald, A., Andersson, L., Fredholm, M., Efors-Lilja, I., (2003): Porcine polymorphisms and methods for detecting them. International application publish under the patent cooperation treaty (PCT).

Jonas, E., Schreinemachers, H-J., Kleinwächter, T., Ün, C., Oltmanns, I., Tetzlaff, S., Jennen, D., Tesfaye, D., (2008): QTL for the heritable inverted teat defect in pigs, *Mamm. Genome* 19, 127-138

Kalm, E.(2000): Möglichkeiten und Grenzen der Marker-gestützten Selektion. 18.

Hülsenberger Gespräche 2000, Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg, 119-126

Kaminski, S., Ahman, A., Rusc, A., Wojcik, E., Malewski, T., (2005): MilkProtChip – a microarray of SNPs in candidate genes associated with milk protein biosynthesis – development and validation. *J. Appl. Genet.* 2005, 46, 45-58

Kaminski, S., Help, H., Brym, P., Rusc, A., Wojcik, E., (2008): SniPork – a microarray of SNPs in candidate genes potentially associated with pork yield and quality- development and validation in commercial breeds. *Anim. Biotechnol.* 2008, 19, 43-69

Karlskov-Mortenson, P., Bruun, C. S., Braunschweig, M. H., Sauera, M., (2006): Genome-wide identification of quantitative trait loci in a cross between Hampshire and Landrace I: carcass traits. *Anim. Genet.* 37, 156-162

Keats, B. J., Sherman, S. L., Morton, N. E., Robson, E. B., Buetow, K. H., Cartwright, P. E., Chakravarti, A., Franke, U., Green, P. P., Ott, J., (1991): Guidelines for human linkage maps (ISLM). *Genomics* 9, 557-60

Kim, E. S., Hong, Y. H., Min, W., Lillehoj, H. S., (2006): Fine-Mapping of Coccidia-Resistant Quantitative Trait Loci in Chickens. *Poultry Sci.* 85, 2028-2030

Kixmüller, M (2004): Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie. *Vet.Med.Diss., München*

Kraft, W., U.M. Dürr, M. Füll, H. Bostedt, K. Heinritzi (1999): Leber, In: Kraft, W., U. M. Dürr (Hrsg), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, Schatauer, 112-133

Kuehn, Ch., Freyer, G., Weikard, R., Goldammer, T., Schwerin, M., (1999): Detection of QTL for milk production traits in cattle by application of aspecifically developed marker map of BTA6. *Anim. Genet.* 30, 333-340

Lee, S. H., Cho, K. K., Kang, S. K., Kim, C. W., Park, H. C., Choy, Y. H., (2002): Detection of pigs resistant to post-weaning diarrhoea, oedema disease and porcine stress syndrome by allele-specific polymerase chain reaction. *Anim. Genet.* 33, 237-39

Lia, M., Barouki, B., Waelsch, S. G., (1995): Chromosomal deletions around the albino locus in the mouse cause loss of hormone-inducible expression of the unlinked structural gene encoding cytosolic aspartate aminotransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 788-790

Lloyd, S. E., Uphill, J. B., Targonski, P. V., Fisher, E. M. & Collinge, J., (2002): Identification of genetic loci affecting mouse-adapted bovine spongiform encephalopathy incubation time in mice. *Neurogenetics* 4, 77-81

Löscher, W.; Narkotika: In Löscher, W., Ungemach, F. R., Kroker, R., Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Parey, 66-82

Lunney, J.K. und Murrel, K.D. (1988): Immunogenetic analysis of *Trichinella spiralis* infections in swine. *Vet. Parasitologie* 29, 179-193

Madden, K. B., Moeller, R. F., Douglass, L.W. Goldman, T., Lunney, J. K. (1993): *Trichinella spiralis*: genetic basis and kinetics of the anti-encysted muscle larval response in miniature swine. *Exp. Parasitologie* 77, 23-35

Massaad, C., Garlatti, M., Wilson, E. M., Cadepond, F., Barouki, R., (2000): A natural sequence consisting of overlapping glucocorticoid-responsive elements mediates glucocorticoid, but not androgen, regulation of gene expression. *Biochem. Journal* 350, 123-129

McEvan, J. C., Gibbs, R., Weinstock, G., Payne, G. M., Oddy, V. H., Nicholas, F. W., Balrymple, B. P., International Sheep Genomics Consortia (2008): 454 Sequencing and SNP discovery in sheep: Project design and interim results. *Plant & Animal Genomes Conference*, http://www.intl-pag.org/16/abstracts/PAG16_W11_93.html.

Magnusson, U., Bosse, J., Mallard, B.A., Rosendahl, S., Wilkie, B.N., (1997): Antibody response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigens after vaccination of pigs bred for high and low immune response. *Vaccine* 15, 997-1000

Meeker, D.L., Rothschild, M., Christian, LL., Warner, C.M., Hill, H.T., (1987): Genetic control of immune response to pseudorabies and atrophic rhinitis vaccines: Heterosis, general combining ability and relationship to growth and back fat. *J. Anim. Sci.* 64, 407-413

Merk, B., (1992): Einfluss von Alter, Rasse, Haltung, Fütterung und Fortpflanzungsstadium auf Serumenzymwerte beim Schwein, *Vet. Med. Diss., München*

Meuwissen, T. H. E., van Arendonk, J. A. M. (1992): Potential improvements in rate of genetic gain from marker-assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *J.Diary Sci.* 75, 1651-1659

Moreno, C. R., Lantier, F., Lantier, I., Sarradin, P., Elsen, J. M., (2003): Detection of new quantitative trait loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics* 165, 2085-91

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

Murray, M., Stear, M. J., Trail, J.C.M., D'Leteren, G.D.M., Agyemang, K., Dwinger, R.H., (1991): Trypanosomiasis in cattle. Prospects for control. In: Axford F.F. E. Bishop, S., Nicholas, F., Owen, J., *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. Wallingford, CABI, 203-223

Nagashima, F., Tanase, S., Fukumoto, Y., Joh, T., Nomiyama, H., Tsuzuki, T., Shimada, K., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Morino, Y., (1989): cDNA cloning and expression of pig cytosolic aspartate aminotransferase in *Escherichia coli*: amino terminal heterogeneity of expressed products and lack of its correlation with enzym function. *Biochemistry* 28, 1153-1160

Nguyen, V. P., Wong, C. W., Hinch, G., Singh, D., Colditz, I., (1998): Variation in the immune status of two Australian pig breeds. *Aust. Vet. J.* 76, 613-617

Obaru, K., Tsuzuki, T., Setoyama, C., Shimada, K., (1988): Structural Organization of the Mouse Aspartate Aminotransferase Isoenzyme Genes. *J. Mol. Biol.* 200, 13-22

Oura, C. A., Powell, E. C., Anderson, E., Parkhouse, R. M. (1998): The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *J. Gen. Virol.* 79, 1439-1443

Pave-Preux, M., Aggerbeck, M., Veyssier, C., Bousquet-Lemercier, B., Hanoune, J., (1990): Hormonal Discrimination among Transcription Start Sites of Aspartate Aminotransferase, *J. Biol. Chem.* 265, 4444-4448

Pave-Preux, M., Ferry, N., Bouguet, J., Hanoune, J., Barouki, R., (1988): Nucleotide Sequence and Glucocorticoid Regulation of the mRNAs for the Isoenzymes of Rat Aspartate Aminotransferase. *J. Biol. Chem.* 263, 17459-17466

Praslickova, D., Sharif, S., Sarson, A., Abdul-Careem, M. F., Zadworny, D., Kulenkamp, A., Ausah, G., Kuhnlein, U., (2008): Association of a Marker in the Vitamin D Receptor Gene with Marek's Disease Resistance in Poultry. *Poultry Sci.* 87, 1112-1119

Pschyrembel, W., *Klinisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter, 259. Auflage, 438-39

Reiner, G., Melchinger, E., Kramarova, M., Pfaff, E., Buttner, M., Saalmüller, A., Geldermann, H., (2002): Detection of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to pseudorabies virus in swine, *J. Gen. Virol.* 83, 167-172

Reiner, G., (2006): Krankheitsresistenz beim Schwein. In: Heinritzi, K., Gindele, H. R., Reiner, G., Schnurrbusch, U., *Schweinekrankheiten*, Ulmer, 345-350

Reiner, G., Fischer, R., Hepp, S., Berge, T., Köhler, F., Willems, H., (2007a): Quantitative Trait loci for red blood cell traits in swine. *Anim. Genet.* 38, 447-52

Reiner, G., Kliemt, D., Willems, H., (2007b): Mapping of quantitative trait loci affecting resistance/susceptibility to *Sarcocystis miescheriana* in swine. *Genomics* 89, 638-46

Reiner, G., Hepp, S., Hertrampf, B., Kliemt, D., Mackenstedt, U., Dauschies, A., Zahner, H., (2007c): Genetic resistance to *Sarcocystis miescheriana* in pigs following experimental infection. *Vet. Parasitology* 145, 2-10

Reiner, G., Fischer, R., Hepp, S., Berge, T., Köhler, F., Willems, H., (2008): Quantitativ trait loci for white blood cell numbers in swine. *Anim. Genet.* 38, 163-8

Reiner, G., Clemens, N., Fischer, R., Köhler, F., Berge, T., Hepp, S., Willems, H., (2009): Mapping of quantitative trait loci for clinical-chemical traits in swine. *Anim. Genet.* 40, 57-64

Reinsch, N., Xu, N., Thomsen, H., Looft, C., Kalm, E., Gruppe, S., Kühn, Ch., Schwerin, M., Leyhe, B., Hiendleder, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Förster, M., Brenig, B., Reents, R., Averdunk, G., (1998): First results on somatic cell count loci from ADR bovine mapping project. *Proc. 6. WCGLAP* 26, 426-428

Rhee, S., Silva, M. M., Hyde, C., Rogers, P. H., Metzler, C. M., Metzler, D. E., Arnone, A., (1997): Refinement and Comparisons of the Crystal Structures of Pig Cytosolic Aspartate Aminotransferase and Its Complex with 2-Methylaspartate. *J. Biol. Chem.* 272, 17293-17302

Roberts, D.J., Gray, A.R. (1973): Studies on trypanosome resistant cattle. The effect of trypanosomiasis on N'Dama, Muturu and Zebu cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 5, 220-233

Ronaghi, M., Elahi, E., (2002): Discovery of single nucleotide polymorphisms and mutations by Pyrosequencing. *Comparative and Functional Genomics* 3, 51-56

Rothschild, M.F., Chen, H.L., Christian, LL, Lie, W.R., Vernier, L., (1984): Breed and swine lymphocyte antigen haplotype differences in agglutination titers following vaccination with *B.bronchiseptica*. *J. Anim. Sci.* 59, 643-649

Rothschild, M. F., Messer, L., Day, A., Wales, R., Short, T., Southwood, O., Plastow, G., (2000): Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mamm. Genome* 11, 75-77

Rothschild, M. F., Hu, Z., Jiang, Z., (2007): Advances in QTL Mapping in Pigs. *Intern. J. Biol. Sci.* 3, 192-197

Sahana, G., Lund, M. S., Andersson-Eklund, L., Hastings, N., Fernandez, A., Iso-Touru, T., Thomsen, B., Viitala, S., Sörensen, P., Williams, J. L., Vilkki, J., (2008): Fine-mapping QTL for mastitis resistance on BTA9 in three Nordic red cattle breeds. *Anim. Genet.* 39, 354-62

Sayers, S., Good, B., Hanrahan, J- P., Ryan, M., Angeles, J. M., Sweeney, T., (2005): Major histocompatibility complex DRB1 gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep. *Parasitology* 131, 403-9

Schwerin, M., Maak, S., Dorroch, U., Brockmann, G., (2000): Die strukturelle und funktionelle Genomanalyse im Dienste einer tiergerechten Haltung und der Verbesserung der Qualität tierischer Produkte. „Qualität von Futtermitteln und tierischen Primärprodukten“. Wissenschaftliche Vortragstagung der Institute für Tierzucht und Tierhaltung mit Tierklinik sowie Ernährungswissenschaften. Halle, Nov. 2000, Tagungsband

Scott, L., Mohlke, K. L., Bonnycastle, L. L., Willer, C. J., Li, Y., Duren, W. L., Erdos, M., Stringham, H., Chines, P. S., Jackson, A. U., Prokunina-Olson, L., (2007): A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341-45

Simianer, H., (2000): Neue Zuchtstrategien dank moderner Gentechnik. *Schweinezucht und Schweinemast* 6, 56-59

Smale, S. T., Kadonaga, J. T., (2003): The RNA polymerase II core promotor. *Annu. Rev. Biochem.* 2003, 72, 449-79

Smith, C., Simpson, S. P., (1986): The use of genetic polymorphisms in livestock improvement. *J. Anim. Breed. Genet.* 103, 205-217

Soller, M., (1994): Marker-assisted selection – an overview. *Anim. Biotech.* 5, 193-207

Stranzinger, G., Went, D. F. (1996): Molecular genetics as a diagnostic tool in farm animals. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2, 447-464

Streyer, L., *Enzyme: Grundlegende Konzepte und Kinetik*, In: Berg, J. M., Streyer, L., Tymoczko, J. L., *Biochemie*, Spektrum, 588-89

Sun, H., Wang, L., Rothschild, M., Tuggle, C., (1998): Mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene to pig chromosom 15. *Anim. Genet.* 29, 138-140

Tenter, A. M. (1995): Current research on *Sarcosystis* species of domestic animals. *Int. J. Parasit.* 25, 1311-1330

Thuy, N. T. D., Melchinger-Wild, E., Kuss, A. W., Cuong, N. V., Bartenschlager, H., Geldermann, H., (2006): Comparison of Vietnamese and European pig breeds using microsatellites. *J. Anim. Sci.* 84, 2601-08

Trail, J., Wissocq, N., d'Ieteren, G., Kakiese, O., Murray, M., (1994): Quantitative phenotyping of N'Dama cattle for aspects of trypanotolerance under field tsetse challenge. *Vet. Paras.* 55, 185-195

Tomkiewicz, C., Muzeau, F., Edgar, D., Barouki, R., Aggerbeck, M., (2004): Opposite regulation of the rat and human cytosolic aspartate aminotransferase genes by fibrates. *Biochem. Pharmacology* 67, 213-225

Tuggle, C. K., Schmitz, C., Gingerich-Feil, B., (1997): Rapid communication: cloning of a pig full-length natural resistance associated macrophage protein (Nramp1) cDNA. *J. Anim. Sci.* 75, 277-288

Vögeli, P., Meijerink, E., Fries, R., Neuenschwander, S., Vorlander, N., Stranzinger, G., (1997): A molekular test for the detection of E.coli F18 receptors: a breakthrough in the struggle against edema disease and post.weaning diarrhea in swine. *Schweiz. Arch. Tierheilkunde* 139, 479-484

Wan, L., Sun, K., Ding, Q., Cui, Y., Li, M., Wen, Y., Elston, R. C., Fu, W. (2009): Hybridization modeling of oligonucleotide SNP arrays for accurate DNA copy number estimation. *Nucleic Acids Research* 37, 17, 117

Wang, C.Y., Huang, Y.Q., Shi, J.D., Marron, M.P., Ruan, Q.G., Hawkins-Lee, B., (1999): Genetic homogeneity, high resolution mapping, and mutation analysis of the urofacial (ochoa) syndrom and exclusion of glutamate oxalacetate transaminase gene (GOT1) in the critical region as the disease gene. *Am. J. Med. Genet.* 84, 454-459

Wiedemann, S., Fries, R., Thaller, G., (2005): Genomewide Scan for Anal Atresia in Swine Identifies Linkage and Association With a Chromosome Region on *Sus scrofa* Chromosom 1. *Genetics* 171, 1207-1217

Wigley, P., Hulme, S. D., Bunstead, N., Barrow, P. A., (2002): In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SAL1 locus. *Microbes Infect.* 4, 1111-20

Wilkie, B.N., Mallard, B., (2000): Genetic aspects of health and disease in Pigs. In: Breeding for Disease resistance in farm animals. Axford, R.F.E., Bishop, S.C., Nicholas, F., Wallingford, CABI, 379-396

Yonash, N., Bacon, L. D., Witter, R. L., Cheng, H. H., (1999): High resolution mapping and identification of new quantitative trait loci (QTL) affecting susceptibility to Marek's disease. Anim. Genet. 30, 126-135

Yunis, R., Heller, E. D., Hillel, J., Cahaner, A., (2002): Mikrosatellite markers associated with quantitative trait loci controlling antibody response to Escherichia coli and Salmonella enteritidis in young broilers. Anim. Genet. 33, 407-414

Zielasko, B., Petrich, J., Trautwein, G., Rommel, M., (1981): Untersuchungen über pathologisch-anatomische Veränderungen und die Entwicklung der Immunität bei der Sarcocystis suicanis-Infektion. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 223-228

Zieleniewicz, D.(2009): Untersuchung zu Assoziationen von Mikrosatelliten und Kandidatengenomen mit der Scrapieempfindlichkeit beim Schaf. Vet.Med.Diss., Giessen

9 Anhang

Alignment: Exon 4, AST, forward Primer

```
Mumm .seq -----TNCTATCGCTATTGGGATACCGAGAAGAG--AGGACTTGAT
Mustang.seq -----TCGGTNCTATCGCTATTGGGATACCGAGAAGAG--AGGACTTGAT
M 689 .seq CCGTCGTAAACAGACTTCGGTCCTCTCGCTTTCGGGATCCCGAGAAGAAGAAGGACTTGAT
M690 .seq -----
```

```
Mumm .seq CTCCAGGGTTTC
Mustang.seq CTCCAGGGTTT-
M689 .seq CTCCAGGGTT--
M690 .seq -----
```

Alignment: Exon 4, AST, reverse Primer

```
Mumm .seq -----GCAGTAGTGAAGACTCCATTGTGATTTT
Mustang.seq GAATGTCTTTGAATCCAGCAGTAGTGAAGACTCCATTGTGATT--
M689 .seq -----
M690 .seq -----
```

Alignment: Exon 5, AST, forward Primer

```
M689 .seq -----C-----
Mumm .seq -----CGACCCAACTTCCAGAAGCAGTGGAAGCA-----
M690 .seq -----ACTCC--GGAGCAGTGGAAGCAGATCGCCTCTGTCATGAAG
Mustang.seq CGACAGGGACCGACCCAACTCC--AGAGCAGTGGAAGCAGATCGCCTCTGTCATGAAG
```

*

Alignment: Exon 5, AST, reverse Primer

```
M689 .seq -----C-----
Mumm .seq -----TTCGGGTTTGTGGGCACAGGCGTNGGAGGACAA-----
M690 .seq GGGTCGGTCCCTGTTCGGGTTGTGGGCACAGGCGTGG-AGGACAAAAGATGGAGAACTCAGG
Mustang.seq GGGTCGGTNCNTGTTCGGGTTGTGGGCACAGGCGTGG--AGMNNAAGATGGAGAACTCAGG
```

M689 .seq -----
Mumm .seq -----
M690 .seq AGCGT--
Mustang.seq AGCGTTA

Alignment: Exon 6, AST, forward Primer

M690 .seq -----CTGGCACCTAGAAAAGACGCCTGGGCCATTTCGCTATTTTGTGTCTGAAGGGTT
Mumm .seq -----TTTGTGTCTGAAGGGTT
Mustang.seq TTTCGCATCTGGCACCTAGAAAAGACGCCTGGGCCATTTCGCTATTTTGTGTCTGAAGGGTT
M689 .seq -----TGGCACCTAGAAAAGACGCCTGGGCCATTTCGCTATTTTGTGTCTGAAGGGTT

M690 .seq CGAGCTCTTCTGTGCCCAGTCCTTCTCCAAGAACTTCGGG-CTCTACA
Mumm .seq CGAGCTCTTCTGTGCCCAGTCCTTCTCCAAGAACTTCGGG-CTCTACA
Mustang.seq CGAGCTCTTCTGTGCCCAGTCCTTCTCCAAGAACTTCGGG-CTCTACA
M689 .seq CGAGCTCTTCTGTGCCCAGTCCTTCTCCAAGAACTTCNNGGCTCTAC-
***** * *****

Alignment: Exon 6, AST, reverse Primer

Mustang.seq GAACCCTTCAGACACAAAATAGCGAATGGCCCAGGCGTCTTTTTCTAGGTTGCCAGATGC
Mumm .seq -----CGAATGGCCCAGGCGTCTTTTTCTAGGTTGCCAGATGC
M690 .seq --ANCCTTCAGACACAAAATAGCGAATGGCCCAGGCGTCTTTTTCTAGGTTGCCAGATGC
M689 .seq -----AAATAGCGAATGGCCCAGGCGTCTTTTTCTAGGTTGCCAGATGC

Mustang.seq GAAGCCCTGATAGGCTGAGTCAAAGAAGGGGAACAGAAACCGGCG
Mumm .seq GAAGCCCTGATAGGCTGAGTCAAAGAAGGGGAACAGAAACCGGCG
M690 .seq GAAGCCCTGATAGGCTGAGTCAAAGAAGGGGAACAGAAACCGGCG
M689 .seq GAAGCCCTGATAGGCTGAGTCAAAGAAGGGGAACAGAAACCGGCG

Alignment: Exon 7, AST, forward Primer

```
M689 .seq -----CGTGCGAGTGACGTGGTCCAATCCCCCTGCTCAGGGAGCGAGAATCGT
Mumm .seq GATGGAGAAGATCGTGCGAGTGACGTGGTCCAATCCCCCTGCTCAGGGAGCGAGAATCGT
                *****

M689 .seq GGCCCGTACGCTCTCTGACCCTGAG
Mumm .seq GGCCCGTACGCTCTCTGACCCTGAG
                *****
```

Alignment: Exon 7, AST, reverse Primer

```
M689 .seq --TCTCGCTCCNNGAGCAGGGGATTGGACCACGTCACTCGCACGATCTTCTCCATCTGG
Mumm .seq -----GGACCACGTCACTCGCACGATCTTCTCCATCTGG
Mustang.seq ATTCTCGCTCCCTGAGCAGGGGATTGGACCACGTCACTCGCACGATCTTCTCCATCTGG
M690 .seq -TTCTCGCTCCCTGAGCAGGGGANNGACCACGTCACTCGCACGATCTTCTCCATCTGG
                *****

M689 .seq GAAAGGACTCGCAGGATGCTATCGGGTTCTTTTGAACCACGGTCAGGTTCCCCACGCAC
Mumm .seq GAAAGGACTCGCAGGATGCTATCGGGTTCTTTTGAACCACGGTCAGGTTCCCCACGC--
Mustang.seq GAAAGGACTCGCAGGATGCTATCGGGTTCTTTTGAACCACGGTCAGGTTCCCCACGCGN
M690 .seq GAAAGGACTCGCAGGATGCTATCGGGTTCTTTTGAACCACGGTCAGGTTCCCCACGNAC
                *****

M689 .seq TC--
Mumm .seq ----
Mustang.seq TCAT
M690 .seq TCAT
```

Alignment: Exon 8, AST, forward Primer

```
M690 .seq TGAGCTTAGGGCACGATT-AGAAGCCCTCAAGACCCCTGGAACCTGGAACCACATCACGG
Mustang.seq TGAGCTTAGGGCACGATT-AGAAGCCCTCAAGACCCCTGGAACCTGGAACCACATCACGG
M689 .seq TGAGCTTAGGGCACGATT-AGAAGCCCTCAAGACCCCTGGAACCTGGAACCACATCACGG
Mumm .seq -----GGCACGATTTAGAAGCCCTCAAGACCCCTGGAACCTGGAACCACATCACGG
                *****
```

```
M690 .seq ACCAGATTGGAATGTTTCAGCTTCACTGGGTTG
Mustang.seq ACCAGATTGGAATGTTTCAGCTTCACTGGGTTG
M689 .seq ACCAGATTGGAATGTTTCAGCTTCACTGGGTT-
Mumm .seq ACCAGATTGGAATGTTTCAGCTTCACTGGGTT-
*****
```

Alignment: Exon 8, AST, reverse Primer

```
M689 .seq -----AGGGCTTTCTAATCGTGCCCTAAGCTCAGATCTCATGCTCAGAATGC
Mumm .seq -----GGGCTTTCTAATCGTGCCCTAAGCTCAGATCTCATGCTCAGAATGC
M690 .seq GTTCAGGGGTCTTGAGGGCTTCTAATCGTGCCCTAAGCTCAGATCTCATGCTCAGAATGC
Mustang.seq GTTCAGGGGTCTTGAGGGCTTCTAATCGTGCCCTAAGCTCAGATCTCATGCTCAGAATGC
*****
```

```
M689 .seq GGTCAGCCATTGTCTTCACGTTACCTG-
Mumm .seq GGTCAGCCATTGTCTTCACGTTACCTG-
M690 .seq GGTCAGCCATTGTCTTCACGTTACCTGT
Mustang.seq GGTCAGCCATTGTCTTCACGTTACCTGT
*****
```

Alignment: Exon 9, AST, forward Primer

```
Mustang.seq GTGTGGCTTAACCACCAAAAATCTAGATTATGTGGCCACCTCCATCCATGAAGCTGTCAC
Mumm .seq TGTGGCTTAACCACCAAAAATCTAGATTATGTGGCCACCTCCATCCATGAAGCTGTCAC
M690 .seq GTGTGGCTTAACCACCAAAAATCTAGATTATGTGGCCACCTCCATCCATGAAGCTGTCAC
M689 .seq GTGTGGCTTAACCACCAAAAATCTAGATTATGTGGCCACCTCCATCCATGAAGCTGTCAC
*****
```

```
Mustang.seq CAAAATCCAGTGAAGCAACACCACCCAAGCCAGCGCCACCCAAGCGGTCCTCTGTCTCGT
Mumm .seq CAAAATCCAGTGAAGCAACACCACCCAAGCCAGCGCCACCCAAGCGGTCCTCTGTCTCGT
M690 .seq CAAAATCCAGTGAAGCAACACCACCCAAGCCAGCGCCACCCAAGCGGTCCTCTGTCTCGT
M689 .seq CAAAATCCAGTGAAGCAACACCACCCAAGCCAGCGCCACCCAAGCGGTCCTCTGTCTCGT
*****
```

Mustang.seq GTGTTCCCTGCCTGCACAAACCTGGTTCTATAACATCACAACTGTATTAGAGGCTACCGAG
Mumm .seq GTGTTCCCTGCCTGCACAAACCTGGTTCTATAACATCACAACTGTATTAGAGGCTACCGAG
M690 .seq GTGTTCCCTGCCTGCACAAACCTGGTTCTATAACATCACAACTGTATTAGAGGCTACCGAG
M689 .seq GTGTTCCCTGCCTGCACAAACCTGGTTCTATAACATCACAACTGTATTAGAGGCTACCGAG

Mustang.seq GGACAGAAAAGGCTGCTCTGGTGAGGTAGCTGCTATTTAAATTGGCCCCATGGGAAGAGA
Mumm .seq GGACAGAAAAGGCTGCTCTGGTGAGGTAGCTGCTATTTAAATTGGCCCCATGGGAAGAGA
M690 .seq GGACAGAAAAGGCTGCTCTGGTGAGGTAGCTGCTATTTAAATTGGCCCCATGGGAAGAGA
M689 .seq GGACAGAAAAGGCTGCTCTGGTGAGGTAGCTGCTATTTAAATTGGCCCCATGGGAAGAGA

Mustang.seq ACATCTCTTGAAAAGAAATGGGGGCCAGGGAATAGAGCCCTTTTGGAGGCCAGAGCAAAT
Mumm .seq ACATCTCTTGAAAAGAAATGGGGGCCAGGGAATAGAGCCCTTTTGGAGGCCAGAGCAAAT
M690 .seq ACATCTCTTGAAAAGAAATGGGGGCCAGGGAATAGAGCCCTTTTGGAGGCCAGAGCAAAT
M689 .seq ACATCTCTTGAAAAGAAATGGGGGCCAGGGAATAGAGCCCTTTTGGAGGCCAGAGCAAAT

Mustang.seq TCAGGCTTTTATTTGAAAAGAATAAAAAGGTCTTTGATCATGAGATGTAGATGTCTTGC
Mumm .seq TCAGGCTTTTATTTGAAAAGAATAAAAAGGTCTTTGATCATGAGATGTAGATGTCTTGC
M690 .seq TCAGGCTTTTATTTGAAAAGAATAAAAAGGTCTTTGATCATGAGATGTAGATGTCTTGC
M689 .seq TCAGGCTTTTATTTGAAAAGAATAAAAAGGTCTTTGATCATGAGATGTAGATGTCTTGC

Mustang.seq CCCCTCACTAGAAGCAGGAGTATTGCCTGTGTCACTCACGTGCTCCTGTGTGTTTTACTC
Mumm .seq CCCCTCACTAGAAGCAGGAGTATTGCCTGTGTCACTCACGTGCTCCTGTGTGTTTTACTC
M690 .seq CCCCTCACTAGAAGCAGGAGTATTGCCTGTGTCACTCACGTGCTCCTGTGTGTTTTACTC
M689 .seq CCCCTCACTAGAAGCAGGAGTATTGCCTGTGTCACTCACGTGCTCCTGTGTGTTTTACTC

Mustang.seq TGTACAAAGTCTAGTCCCAAAGATCAAGTTGTCTGAAGAGCAAAGTGTGATTGTGGGTAT
Mumm .seq TGTACAAAGTCTAGTCCCAAAGATCAAGTTGTCTGAAGAGCAAAGTGTGATTGTGGGTAT
M690 .seq TGTACAAAGTCTAGTCCCAAAGATCAAGTTGTCTGAAGAGCAAAGTGTGATTGTGGGTAT
M689 .seq TGTACAAAGTCTAGTCCCAAAGATCAAGTTGTCTGAAGAGCAAAGTGTGATTGTGGGTAT

Mustang.seq TGGCTGTGTCAATTAACAGTTGTCTCTGGACCCAGAGTGTCTGTCTCCCTGCTCTTTCTG
Mumm .seq TGGCTGTGTCAATTAACAGTTGTCTCTGGACCCAGAGTGTCTGTCTCCCTGCTCTTTCTG
M690 .seq TGGCTGTGTCAATTAACAGTTGTCTCTGGACCCAGAGTGTCTGTCTCCCTGCTCTTTCTG
M689 .seq TGGCTGTGTCAATTAACAGTTGTCTCTGGACCCAGAGTGTCTGTCTCCCTGCTCTTTCTG

```
Mustang.seq      CATGGCTCTGTCCCTAGCCCTAAGCTTGAGTTCTTTAGGGTGGTCAAGGTAGGAAATATA
Mumm   .seq      CATGGCTCTGTCCCTAGCCCTAAGCTTGAGTTCTTTAGGGTGGTCAAGGTAGGAAATATA
M690   .seq      CATGGCTCTGTCCCTAGCCCTAAGCTTGAGTTCTTTAGGGTGGTCAAGGTAGGAAATATA
M689   .seq      CATGGCTCTGTCCCTAGCCCTAAGCTTGAGTTCTTTAGGGTGGTCAAGGTAGGAAATATA
*****

Mustang.seq      TTTATATTTTACCCACACGTTAACTGAAATAAAAAGTTTCACAGAGTCAAATTTACCCCTTA
Mumm   .seq      TTTATATTTTACCCACACGTTAACTGAAATAAAAAGTTTCACAGAGTCAAATTTACCCCTTA
M690   .seq      TTTATATTTTACCCACACGTTAACTGAAATAAAAAGTTTCACAGAGTCAAATTTACCCCTTA
M689   .seq      TTTATATTTTACCCACACGTTAACTGAAATAAAAAGTTTCACAGAGTCAAATTTACCCCTTA
*****

Mustang.seq      CTATGTGGAGTACATTCTGGTATTTTCTATTCTATTCTATTCTATTCTATTCTATTCTAT
Mumm   .seq      CTATGTGGAGTACATTCTGGTATTTTCTATTCTATTCTATTCTATTCTATTCTATTCTAT
M690   .seq      CTATGTGGAGTACATTCTGGTATTTTCTTTTCTATTCTATTCTATTCTATTCTATTCTAT
M689   .seq      CTATGTGGAGTACATTCTGGTATTTTCTTTTCTATTCTATTCTATTCTATTCTATTCTAT
*****

Mustang.seq      TCTATTCTATTCTGT
Mumm   .seq      TCTATTCTATTCTG-
M690   .seq      TCTATTCTGT-----
M689   .seq      TCTATTCTG-----
*****
```

Alignment: Exon 9, AST, reverse Primer

```
M689   .seq      -----GAAAAGAANANCCAGAATGTACTCCACATAGTAAGGGTAAATTTGACTCTG
Mumm   .seq      -----AACCAGAATGTACTCCACATAGTAAGGGTAAATTTGACTCTG
M690   .seq      ATAGAATAGAAAAGAAAATACCAGAATGTACTCCACATAGTAAGGGTAAATTTGACTCTG
Mustang.seq      ATAGAATAGAAATAGAAAATACCAGAATGTACTCCACATAGTAAGGGTAAATTTGACTCTG
*****

M689   .seq      TGAAACTTTTATTTTTCAGTTAACGTGTGGGTAAAATATAAATATATTTTCTACCTTGACCA
Mumm   .seq      TGAAACTTTTATTTTTCAGTTAACGTGTGGGTAAAATATAAATATATTTTCTACCTTGACCA
M690   .seq      TGAAACTTTTATTTTTCAGTTAACGTGTGGGTAAAATATAAATATATTTTCTACCTTGACCA
Mustang.seq      TGAAACTTTTATTTTTCAGTTAACGTGTGGGTAAAATATAAATATATTTTCTACCTTGACCA
*****
```

M689 .seq CCCTAAAGAACTCAAGCTTAGGGCTAGGGACAGAGCCATGCAGAAAAGAGCAGGGAGACAG
Mumm .seq CCCTAAAGAACTCAAGCTTAGGGCTAGGGACAGAGCCATGCAGAAAAGAGCAGGGAGACAG
M690 .seq CCCTAAAGAACTCAAGCTTAGGGCTAGGGACAGAGCCATGCAGAAAAGAGCAGGGAGACAG
Mustang.seq CCCTAAAGAACTCAAGCTTAGGGCTAGGGACAGAGCCATGCAGAAAAGAGCAGGGAGACAG

M689 .seq ACACTCTGGGTCCAGAGGACAACCTGTTAATGACACAGCCAATACCCACAATCACACTTTG
Mumm .seq ACACTCTGGGTCCAGAGGACAACCTGTTAATGACACAGCCAATACCCACAATCACACTTTG
M690 .seq ACACTCTGGGTCCAGAGGACAACCTGTTAATGACACAGCCAATACCCACAATCACACTTTG
Mustang.seq ACACTCTGGGTCCAGAGGACAACCTGTTAATGACACAGCCAATACCCACAATCACACTTTG

M689 .seq CTCTTCAGACAACCTTGATCTTTGGGACTAGACTTTGTACAGAGTAAAACACACAGGAGCA
Mumm .seq CTCTTCAGACAACCTTGATCTTTGGGACTAGACTTTGTACAGAGTAAAACACACAGGAGCA
M690 .seq CTCTTCAGACAACCTTGATCTTTGGGACTAGACTTTGTACAGAGTAAAACACACAGGAGCA
Mustang.seq CTCTTCAGACAACCTTGATCTTTGGGACTAGACTTTGTACAGAGTAAAACACACAGGAGCA

M689 .seq CGTGAGTGACACAGGCAATACTCCTGCTTCTAGTGAGGGGGCAAGACATCTACATCTCAT
Mumm .seq CGTGAGTGACACAGGCAATACTCCTGCTTCTAGTGAGGGGGCAAGACATCTACATCTCAT
M690 .seq CGTGAGTGACACAGGCAATACTCCTGCTTCTAGTGAGGGGGCAAGACATCTACATCTCAT
Mustang.seq CGTGAGTGACACAGGCAATACTCCTGCTTCTAGTGAGGGGGCAAGACATCTACATCTCAT

M689 .seq GATCAAAGGACCTTTTTATTCTTTTCAAATAAAAAGCCTGAATTTGCTCTGGCCTCCAAA
Mumm .seq GATCAAAGGACCTTTTTATTCTTTTCAAATAAAAAGCCTGAATTTGCTCTGGCCTCCAAA
M690 .seq GATCAAAGGACCTTTTTATTCTTTTCAAATAAAAAGCCTGAATTTGCTCTGGCCTCCAAA
Mustang.seq GATCAAAGGACCTTTTTATTCTTTTCAAATAAAAAGCCTGAATTTGCTCTGGCCTCCAAA

M689 .seq GGGCTCTATTCCCTGGCCCCATTTCTTTTCAAGAGATGTTCTCTTCCCATGGGGCCAAT
Mumm .seq GGGCTCTATTCCCTGGCCCCATTTCTTTTCAAGAGATGTTCTCTTCCCATGGGGCCAAT
M690 .seq GGGCTCTATTCCCTGGCCCCATTTCTTTTCAAGAGATGTTCTCTTCCCATGGGGCCAAT
Mustang.seq GGGCTCTATTCCCTGGCCCCATTTCTTTTCAAGAGATGTTCTCTTCCCATGGGGCCAAT

M689 .seq TTAAATAGCAGCTACCTCACCAGAGCAGCCTTTTCTGTCCCTCGGTAGCCTCTAATACAG
Mumm .seq TTAAATAGCAGCTACCTCACCAGAGCAGCCTTTTCTGTCCCTCGGTAGCCTCTAATACAG
M690 .seq TTAAATAGCAGCTACCTCACCAGAGCAGCCTTTTCTGTCCCTCGGTAGCCTCTAATACAG
Mustang.seq TTAAATAGCAGCTACCTCACCAGAGCAGCCTTTTCTGTCCCTCGGTAGCCTCTAATACAG

M689 .seq TTGTGATGTATAGAACCAGGTTTGTGCAGGCAGGGAACACACGAGACAGAGGACCGCTTG
Mumm .seq TTGTGATGTATAGAACCAGGTTTGTGCAGGCAGGGAACACACGAGACAGAGGACCGCTTG
M690 .seq TTGTGATGTATAGAACCAGGTTTGTGCAGGCAGGGAACACACGAGACAGAGGACCGCTTG
Mustang.seq TTGTGATGTATAGAACCAGGTTTGTGCAGGCAGGGAACACACGAGACAGAGGACCGCTTG

M689 .seq GGTGGCGCTGGCTTGGGTGGTGTGCTTCACTGGATTTTGGTGACAGCTTCATGGATGGA
Mumm .seq GGTGGCGCTGGCTTGGGTGGTGTGCTTCACTGGATTTTGGTGACAGCTTCATGGATGGA
M690 .seq GGTGGCGCTGGCTTGGGTGGTGTGCTTCACTGGATTTTGGTGACAGCTTCATGGATGGA
Mustang.seq GGTGGCGCTGGCTTGGGTGGTGTGCTTCACTGGATTTTGGTGACAGCTTCATGGATGGA

M689 .seq GGTGGCCACATAATCTAGATTTTTGGTGGTTAAGCCACACATGTTGATCCGACCACTTGG
Mumm .seq GGTGGCCACATAATCTAGATTTTTGGTGGTTAAGCCACACATGTTGATCCGACCACTTGG
M690 .seq GGTGGCCACATAATCTAGATTTTTGGTGGTTAAGCCACACATGTTGATCCGACCACTTGG
Mustang.seq GGTGGCCACATAATCTAGATTTTTGGTGGTTAAGCCACACATGTTGATCCGACCACTTGG

M689 .seq TAGCAGATAGATGTGCTTTTTCGTTGATCAGATAT---
Mumm .seq TAGCAGATAGATGTGCTTTTTCGTTGATCA-----
M690 .seq TAGCAGATAGATGTGCTTTTTCGTTGATCAGATATTC-
Mustang.seq TAGCAGATAGATGTGCTTTTTCGTTGATCAGNTATTCA

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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 wissenschaftlichen Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner. Er hat mir die Bearbeitung dieses Themas ermöglicht und stand mir bei der Anfertigung der Dissertation immer mit Rat und Engagement zur Seite. Mein Dank gilt zusätzlich der guten Zusammenarbeit in der Klinik für Schweine.

Mein Dank gilt PD Dr. H. Willems, der sich durch seine äußerst geduldige Einarbeitung in die Labormethoden des molekularen Labors der Klinik für Schweine ausgezeichnet hat. Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern Frau Hopf und Frau Stoll.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung bei der Verwirklichung aller meiner Ziele.

Meinen Freunden Carina & Ralf, Clara & Roland, Davina, Eva & Wilfried, Jessi & Carsten, Judith, Jule, Julia, Karoline & Lorenz, Kristin & Andreas, Michael, Pascal, Simone, Suse, Heike & Björn danke ich für die fröhlichen Zeiten abseits der Doktorarbeit.

Steffi danke ich für ihre Rolle als Telefonjoker und auch für alles andere.

Der Tierarztpraxis Fritsche danke ich für lehrreiche Jahre bei den Kleintieren.

Der Tierarztpraxis Pabst, insbesondere meinen Kolleginnen Steffi, Anita und Svenja, danke ich für die flexible Gestaltung meiner Arbeitszeit.

Allen Doktoranden der Klinik für Schweine danke ich für die vielen lustigen Stunden im Labor und auch außerhalb der Klinik.



edition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG STAUFBENGRING 15 D-35396 GIESSEN	ISBN: 978-3-8359-5689-6
Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890 redaktion@doktorverlag.de www.doktorverlag.de	 9 783835 195689 6