

Genetische Diversität und Disposition des Hausschweins zur Atemwegsinfektion

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biologin Inga Probst

Geboren am 27.01.1974 in Hildesheim

(2009)

Referent: Prof. Dr. Burkhard Tümmler

Korreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 27.02.2009

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung nach §6 Absatz 1b) der Ordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät für die Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Hiermit erkläre und versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und die dabei benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie alle zu Hilfsleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Hannover, 15.12.2008

Inga Probst

Danksagung

Diese Arbeit wurde von Oktober 2005 bis Dezember 2008 in der Klinischen Forschergruppe der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Anleitung von Herrn Professor Burkhard Tümmler durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Tümmler für die Überlassung des interessanten Themas und der hervorragenden wissenschaftlichen Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Walter Müller danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. Frauke Stanke danke ich ganz herzlich für die jederzeit gewährte Hilfe bei allen möglichen Problemen während der praktischen Durchführung dieser Arbeit und ganz besonders für die geduldige Unterstützung in den letzten Monaten bei der Auswertung der Daten.

Frau Silke Hedtfeld danke ich sehr für die freundliche Einarbeitung in die praktischen Labortechniken, die für diese Arbeit erforderlich waren, und für die generelle gute Zusammenarbeit.

Bei allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken.

Den Familien Naschitzki, Häsker, von Veen und dem Hof Johannis Hag danke ich für die freundliche Unterstützung meines Projektes durch die Überlassung von Blut- und Leberproben ihrer Schweine zur Genotypisierung.

Allen Mitarbeitern des IRAS-Konsortiums danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie, allen Freunden und besonders Mathias danke ich für ihre Geduld und die moralische Unterstützung.

Zusammenfassung

Atemwegserkrankungen beim Schwein stellen aufgrund hoher Kosten für Antibiotikabehandlungen und einer erhöhten Mortalität der Ferkel ein enormes wirtschaftliches Problem für Landwirte in Europa dar. Die Hauptpathogene (z.B. *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sind in den Schweinepopulationen weit verbreitet und werden hauptsächlich durch asymptomatische Trägartiere über Aerosole verbreitet. Zur Zeit stehen keine Impfstoffe zur Verfügung, die nicht nur die Symptome einer Infektion reduzieren, sondern auch die Kolonisation mit den Pathogenen verhindern. Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse an der Identifizierung von Genen, die die Suszeptibilität von Schweinen gegenüber Atemwegserkrankungen modulieren.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des vom BMBF geförderten Verbundprojektes IRAS (Infektabwehr und Resistenz im Atemtrakt des Schweines) angefertigt, dessen Ziel die Entwicklung von genetischen Markern ist, mit deren Hilfe langfristig in Zuchtprogrammen eine Selektion von Tieren ermöglicht werden soll, die resistent oder weniger suszeptibel gegenüber Atemwegserkrankungen sind.

Für die Entwicklung hochinformativer Mikrosatellitenmarker wurde eine nach Priorität sortierte Liste von 102 Kandidatengenen erstellt. Die Gene hoher Priorität gehören größtenteils zum angeborenen Immunsystem (z.B. Toll-like Rezeptoren). Weiterhin wurden Gene untersucht, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie in Zusammenhang mit einer *A. pleuropneumoniae* Infektion beim Schwein stehen (z.B. PR39). Zur Identifizierung geeigneter Mikrosatellitenmotive innerhalb oder nahe bei den gewünschten Genen wurden falls verfügbar genomische DNA Sequenzen aus der NCBI Datenbank verwendet oder shotgun-Sequenzen porciner BAC-Klone. Für jeden Locus wurden mehrere Oligonucleotid-Motive getestet. Insgesamt konnten im Verlauf dieser Arbeit 36 Marker für 35 Kandidatengene etabliert werden. Mit Hilfe dieser Marker wurden 2 Hauptziele verfolgt. Zum einen die Ermittlung des derzeitigen Genpools unterschiedlicher Schweinepopulationen in Deutschland und zum anderen die vergleichende Genotypisierung von Schweinen aus vier verschiedenen Rassen mit mildem und schwerem Krankheitsverlauf nach *A. pleuropneumoniae* Infektion, um Loci zu identifizieren, die die Suszeptibilität der Tiere gegenüber Atemwegsinfektionen modulieren. Für die Diversitätsstudie standen 74 Proben seltener und / oder alter Schweinerassen, 53 Proben von Herdlinientieren eines deutschen Zuchtverbandes und 69 Proben einer Verbraucherstudie (Fleischproben aus Supermärkten und Schlachtereien aus 30 deutschen Städten) zur Verfügung. Für die Assoziationsstudie wurden 100 Tiere mit definiertem Phänotyp nach Infektion genotypisiert (ein standardisiertes Infektionsmodell wurde an der Tierärztlichen Hochschule Hannover entwickelt).

Die Ergebnisse der Diversitätsstudie zeigen, dass der Allelpool an den untersuchten Resistenzloci in der Verbraucherstudie die größte Vielfalt aufweist und der Allelpool aller untersuchten Rassen im Vergleich dazu verarmt ist. Außerdem wurden signifikante Unterschiede in den Allelverteilungen bei dem Vergleich der Kohorten untereinander beobachtet. Besondere Auffälligkeiten zeigten die untersuchten Hampshire Tiere, da ihr Genpool neben einer Verarmung zusätzlich Allele aufwies, die in der Verbraucherstudie nicht beobachtet wurden. Diese Andersartigkeit scheint assoziiert zu sein mit einer reduzierten Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae*, da die Hampshire Tiere in den Infektionsversuchen den mildesten Krankheitsverlauf zeigten. Die untersuchten Tiere der Rassen Deutsche Landrasse, Deutsches Edelschwein (Large White) und Pietrain wiesen im Vergleich zu den Hampshire Tieren eine höhere Suszeptibilität auf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Grundhypothese, dass die beobachtete unterschiedliche Suszeptibilität der Rassen genetisch bedingt ist. Durch zukünftige Arbeiten wird es möglich sein, diejenigen Gene und funktionellen Mutationen zu identifizieren, die für diese Unterschiede verantwortlich sind.

Schwein, Atemwegsinfektion, Infektionsresistenz, genetische Diversität

Summary

Respiratory tract infections in pigs pose a severe economic problem to farmers in Europe due to immense costs for antibiotic treatments and increased mortality rate among piglets. The main pathogens (e.g. *Actinobacillus pleuropneumoniae*) are widely distributed in pig populations and they are mainly spread by asymptomatic carriers and via aerosol. Vaccines developed so far only alleviate clinical symptoms but do not prevent colonisation by the pathogens.

Therefore there is a strong interest in the identification of genes which modulate the susceptibility of pigs to respiratory tract infections.

This work was performed under the auspices of the project IRAS (Infektabwehr und Resistenz im Atemtrakt des Schweines / Immundefence and Resistance in the respiratory tract of pigs) funded by the BMBF. The aim of the project is the development of genetic markers to predict resistance. By means of these markers a pre-selection of animals with reduced susceptibility to respiratory tract infections shall be enabled in breeding programs.

For the development of highly informative microsatellite markers 102 candidate genes were chosen and sorted by priority. The genes with high priority belong either to the innate immune system (e.g. toll-like receptors) or are supposed to be directly related to an infection with *A. pleuropneumoniae* (e.g. PR39). For identification of suitable microsatellite motifs within or in proximity of the target gene genomic porcine sequences available in the NCBI database or shotgun genomic sequences from porcine BACs have been used. For each locus several oligonucleotide-motifs have been tested. During this work 36 markers covering 35 candidate genes could be established. By means of these markers two different objectives were pursued. The first aim was the investigation of the current gene pool in different pig populations in Germany. The second aim was the comparative genotyping of pigs from four different breeds with a mild or severe course of disease after infection with *A. pleuropneumoniae* in order to identify loci which modulate the susceptibility of the animals to respiratory tract infections. For the diversity study 74 samples from rare and / or old pig breeds were taken, 53 samples from herdbook animals from a German breeding organisation and 69 samples from a consumer study (meat samples bought in supermarkets and butcheries in 30 cities all over Germany). For the association study 100 animals with defined phenotype after infection have been genotyped (infection model standardized by the Tierärztliche Hochschule Hannover).

The results of the diversity study revealed the highest variety of the gene pool at the analysed marker loci for resistance in the consumer study samples whereas the gene pool of the examined breeds was found to be less diverse in comparison to the consumer study.

Furthermore the allele distributions of the analysed breeds differ significantly when compared to each other.

Surprising results were found for the Hampshire animals as their gene pool was not only reduced but additional alleles appeared which were not detected among the animals genotyped for the consumer study.

This genomic distinctiveness seems to be associated with a reduced susceptibility to an infection with *A. pleuropneumoniae* as the Hampshire animals showed the mildest course of disease after infection with *A. pleuropneumoniae*. For the examined animals of the breeds German Landrace, German Large White and Pietrain a higher susceptibility compared to the Hampshire pigs was found.

By the results of this work the hypothesis that different susceptibility of pig breeds is due to genetic factors could be confirmed. Future work will allow an identification of genes and causative variants which are responsible for these differences.

Pig, respiratory tract infections, resistance to infectious diseases, genetic diversity

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Domestikation von Schweinen und Rassenbildung	1
1.2	FUGATO-Verbundprojekt IRAS	2
1.3	Mikrosatelliten als genetische Marker	4
1.4	Das Schweinengenomprojekt	6
1.5	Kandidatengene	7
1.6	Ziele der Arbeit	9
1.6.1	Markerentwicklung	9
1.6.2	Assoziationsstudie	9
1.6.3	Diversitätsstudie	10
2	Methoden und Probenmaterial	11
2.1	Kandidatengene	12
2.1.1	Sequenzbeschaffung zu Kandidatengenen	17
2.2	BAC-Kultivierung	18
2.3	Identifizierung geeigneter Mikrosatellitenmotive	19
2.4	Infektionsversuche und Phänotypisierung	20
2.5	Probenmaterial für die Genotypisierung	21
2.5.1	Die Schweinerassen	22
2.5.1.1	Angler-Sattelschwein	22
2.5.1.2	Bunte-Bentheimer	23
2.5.1.3	Deutsches Edelschwein (Large White)	23
2.5.1.4	Deutsche Landrasse	24
2.5.1.5	Hampshire	24
2.5.1.6	Leicoma	25
2.5.1.7	Mangalitza (Wollschwein)	25
2.5.1.8	Mini-Lewe	26
2.5.1.9	Pietrain	26
2.5.1.10	Schwäbisch-Hällisch	27
2.5.1.11	Wildschwein	28
2.5.2	Kohortenzusammensetzung	28
2.5.2.1	Kontrollkohorte	28
2.5.2.2	Vergleichende Genotypisierung	29

2.5.2.2.1	Alte / seltene Schweinerassen und Wildschweine.....	29
2.5.2.2.2	Verbraucherstudie	30
2.5.2.2.3	Herdlinientiere	33
2.5.2.3	Assoziationsstudie.....	34
2.6	Molekularbiologische Methoden	35
2.6.1	Isolierung hochmolekularer DNA aus Blut oder Gewebeproben	35
2.6.2	Quantifizierung von DNA	36
2.6.3	PCR basierte Methoden	37
2.6.3.1	Multiwell-PCR.....	38
2.6.3.2	Etablierung der Konditionen für die Hochdurchsatz-Genotypisierung von Mikrosatellitenmotiven	38
2.6.3.3	Vorgehen zur Überprüfung der DNA-Qualität.....	40
2.6.3.4	GenomiPhi-Amplifikation	40
2.7	Horizontale Agarosegelelektrophorese	41
2.8	Direct Blotting	42
2.8.1	Gelpreparation.....	43
2.8.2	Probenvorbereitung	43
2.8.3	Elektrophorese	44
2.9	CDP-Chemilumineszenzdetektion	45
2.9.1	Auswertung der Röntgenfilme	47
2.10	Statistische Analysen	48
2.10.1	PIC-Wert.....	48
2.10.2	Heterozygotieindex.....	49
2.10.3	Monte Carlo Simulation mit Hilfe der CLUMP-Software	49
2.10.4	Rangtest nach Mann-Whitney	51
3	Ergebnisse und Diskussion	53
3.1	Mikrosatellitenentwicklung	53
3.1.1	Sequenz-Identifizierung zu Kandidatengenen und Markeretablierung.....	53
3.1.2	Klassifizierung der Mikrosatellitenmotive	56
3.1.2.1	Diskussion der Markereinteilung.....	62
3.1.3	Zusammenfassung der Mikrosatellitenentwicklung	65
3.2	Genotypisierung der Kohorten	67

3.2.1	Bewertung der Vorgehensweise zur Informativitätsbestimmung eines Markers	68
3.3	Alleldiversitätsstudie	72
3.3.1	Heterozygotietest für die Verbraucherstudienkohorte.....	72
3.3.2	Globaler Vergleich des Genpools aller untersuchten Kohorten mit der Verbraucherstudie	75
3.3.3	Statistische Signifikanz der Allelbeobachtungszahlen, die nicht Teil der Verbraucherstudie waren	77
3.3.4	Allelverteilungen an Einzelmarkerloci	78
3.3.5	Diskussion der Allelverteilungen in den Kohorten an 12 Markerloci anhand der Balkendiagramme	91
3.3.5.1	Gemischte Kohorten	91
3.3.5.1.1	Die Verbraucherstudie als Referenzkohorte	91
3.3.5.1.2	Genpool der Herdlinientiere der BHZP	92
3.3.5.2	Allelverteilungen der reinrassigen Mastschweintiere	93
3.3.5.3	Allelverteilungen der Wildschweinkohorte	95
3.3.5.4	Schwäbisch-Hällische Schweine als Vertreter einer alten Schweinerasse	95
3.3.5.5	Einzelvergleich der Allelverteilungen in großen Kohorten an den untersuchten Loci mit der Verbraucherstudienkohorte	97
3.3.5.6	Allelverteilungen in Kohorten kleiner Stichprobengröße und verwandter Tiere.....	102
3.4	Phänotypisierung und Assoziationsstudie.....	106
3.4.1	Rasseunterschiede im Schweregrad der Erkrankung.....	107
3.4.1.1	Nicht parametrischer Vergleich des Schweregrades der Erkrankung zwischen den Rassen	107
3.4.1.2	Rangtest nach Mann-Whitney	109
3.5	Assoziationsstudie	111
3.5.1	Das FAMHAP-Programm	111
3.5.2	Tierauswahl für FAMHAP	112
3.5.2.1	Auswahl der extremsten Phänotypen	112
3.5.2.2	Auswahl konkordanter und diskordanter Paare	114
3.5.2.3	Gütetest für die Elternauswahl.....	117
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	123
4.1	Markerentwicklung	123
4.2	Diversitätsstudie	123

4.3	Genotyp-Phänotyp Analyse über die Schweinerassen	124
4.3.1	Die Deutsche Landrasse	124
4.3.2	Pietrain	126
4.3.3	Hampshire	128
4.3.4	Large White	130
4.3.5	Vergleich der Genpools der für die Infektionsversuche verwendeten Rassen untereinander.....	130
4.4	Fazit und Ausblick	132
5	Literaturverzeichnis.....	134
6	Anhang	147
6.1	Allgemeine Geräte und Materialien	147
6.1.1	DNA Isolierung	147
6.1.2	Agarosegelelektrophorese.....	148
6.1.3	Direct Blotting	148
6.1.4	Chemilumineszenzdetektion.....	149
6.1.5	PCR-Reagenzien.....	150
6.1.6	Kultivierung porciner BAC-Klone	151
6.1.7	BAC-Klone.....	151
6.1.8	Allgemeine Geräte.....	152
6.1.9	Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	152
6.2	Verzeichnis der Abkürzungen.....	153
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	154
6.4	Oligonukleotidsequenzen und PCR Bedingungen	155
6.5	Probenherkunft	162
6.6	Allelfrequenzen	166
6.6.1	Rohdaten zur PIC-Wertberechnung für alle Marker.....	166
6.7	Allelverteilungen in den Kohorten.....	170
6.7.1	p-Werte.....	180
6.7.2	Infektionsversuche: Familienstruktur und Rankingwerte	182
6.7.2.1	Tierauswahl für FAMHAP: Extreme Phänotypen.....	188

1 Einleitung

1.1 Domestikation von Schweinen und Rassenbildung

Durch archäologische Funde konnte belegt werden, dass bereits während des Neolithikums ca. 9000 v. Chr. die Domestikation des Schweins in Europa begonnen hat. Die Analyse von mitochondrialer DNA rezenter Populationen (wild und domestiziert) und von DNA-Proben, die aus archäologischen Funden aus Europa und dem Nahen Osten gewonnen wurden, ergab, dass die Domestikation von lokal angesiedelten Europäischen Wildschweinen und von Wildschweinen aus dem asiatischen Raum parallel verlief. Vermutlich gaben die von Bauern aus dem Nahen Osten mitgebrachten Schweine den Anstoß dazu, dass auch die europäischen Bauern anfangen, die heimischen Wildschweine als Haustiere zu halten. Innerhalb von ca. 500 Jahren wurden die aus dem Nahen Osten stammenden Wildschweine jedoch bei der Domestikation in Europa von den einheimischen Schweinen verdrängt. Außerdem verbreiteten sich die europäischen Schweine nach Osten, nachweislich mindestens bis Armenien. Eine gezielte Rassenzucht wurde erst ab der Neuzeit und zunächst vor allem in England betrieben. Um 1770 entstand hier die erste moderne Schweinerasse namens Leicester. Mitte des 19. Jh. folgten zwei Rassen namens Large White und Middle White, die in Deutschland zu Beginn des 20. Jh. zur Veredelung der Landrassen dienten. Laut einer Erhebung im Jahre 1936 in Deutschland machten die Deutschen veredelten Landschweine und die Deutschen weißen Edelschweine mit 71,6 bzw. 19,5% zu dieser Zeit den größten Teil der eingetragenen Rassen aus. Die Züchtung von Schwäbisch-Hällischen Schweinen, Angler Sattelschweinen und Bunten Bentheimer Schweinen spielte nur eine untergeordnete Rolle für die Fleischindustrie. Ab dem Ende der fünfziger Jahre, als alle Zuchtverbände ausschließlich die Züchtung eines „Fleischschweins“ anstrebten, ging die Rassenvielfalt in Deutschland stark zurück. Die Züchtung des „Fleischschweins“ gelang durch Weiterzüchtung des veredelten Landschweins. 1968 gehörten 95% aller Herdbuchtiere der Deutschen veredelten Landrasse an. Erst seit Mitte der achtziger Jahre gibt es vermehrt Programme zur Erhaltung alter Rassen wie z.B. der Bunten Bentheimer Schweine.

Zurzeit werden für die konventionelle Schweinezucht in der Regel Hybridtiere verwendet, die aus der Kreuzung unterschiedlicher Rassen wie z.B. Deutsche Landrasse, Deutsches Edelschwein, Pietrain, Hampshire und Duroc hervorgehen (Larson et al., 2007; Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Rassen).

1.2 FUGATO-Verbundprojekt IRAS

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des FUGATO (Funktionelle Genomanalyse im Tierischen Organismus) –Verbundprojektes IRAS (Infektabwehr und Resistenz im Atemtrakts des Schweins) erstellt. Bei FUGATO handelt es sich um ein seit 2005 vom BMBF gefördertes Projekt, das sich disziplinübergreifend mit der Entwicklung von genetischen Markern zur Infektabwehr und Resistenz im Atemtrakts des Schweins beschäftigt.

Atemwegsinfektionen gehören zu den häufigsten Erkrankungen beim Schwein und stellen somit aufgrund hoher Kosten für Antibiotikabehandlungen ein großes wirtschaftliches Problem für Landwirte in Deutschland und Europa dar (Schoder et al. 1993; Straw et al. 1983; Van Reeth und Pensaert 1994).

Hauptpathogene sind *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* und Influenzaviren. Alle Erreger sind in den derzeitigen Mastschweinpopulationen weit verbreitet, da sie über asymptomatisch infizierte Trägartiere in den Beständen verschleppt werden und bislang keine Impfstoffe zur Verfügung stehen, die nicht nur die klinischen Symptome mildern, sondern auch eine Kolonisation verhindern. Des weiteren stellt auch die zunehmende bakterielle Antibiotikaresistenz im Hinblick auf gesundheitlichen Verbraucherschutz ein wachsendes Problem dar.

Bislang ist eine züchterische Selektion auf verminderte Suszeptibilität gegenüber Atemwegsinfektionen hauptsächlich aufgrund fehlender genetischer Marker nicht möglich. Deshalb ist es Ziel des IRAS-Konsortiums, Kandidatengene zu identifizieren und Marker zu entwickeln, die eine solche Selektion in Zukunft ermöglichen, um langfristig einen Beitrag sowohl zur Schweinegesundheit als auch zur Konsumentengesundheit zu leisten (Ungemach et al. 2004; Gerlach et al. 2007).

Durch ähnliche Versuchsansätze im Bereich der Humanmedizin wurden bereits erfolgreich Gene identifiziert, die die Suszeptibilität gegenüber Infektionskrankheiten beeinflussen. So konnten beispielsweise nach einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) des Wellcome Trust Case Control Consortiums (WTCCC), die mit Hilfe von SNP-Chip-Analysen durchgeführt wurde, für 7 verbreitete Krankheiten (z.B. Arthritis und Diabetes) Genloci benannt werden, die die Suszeptibilität gegenüber diesen Krankheiten beeinflussen (WTCCC 2007). Auch für HIV und Malaria konnten bereits Gene identifiziert werden, die die Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit dem Virus beeinflussen (European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden, 2008; Jilizi et al. 2007; Leoratti et al. 2007).

Aufgrund der hohen Homologie zwischen Mensch und Schwein kann davon ausgegangen werden, dass in Bezug auf Infektionskrankheiten auch ähnliche Resistenzmechanismen zum Tragen kommen bzw. dieselben Gene eine Rolle bei der natürlichen Resistenz gegenüber Infektionskrankheiten spielen, so dass die Ergebnisse dieser Arbeit eventuell auch genutzt werden können, um weitere Modulatoren für humane Infektionskrankheiten zu identifizieren bzw. Erkrankungen besser verstehen zu können.

Das Projekt steht unter der Leitung von Herrn Prof. G. Gerlach (Institut für Mikrobiologie; Tierärztliche Hochschule Hannover). An dem IRAS-Konsortium beteiligt sind Arbeitsgruppen der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, der Medizinischen Hochschule Hannover, des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung, der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und dem Max-Planck-Institut für Molekulargenetik. Als assoziierte Firmen sind die IVD-GmbH Hannover, LIONEX GmbH Braunschweig und die Atlas Biolabs GmbH beteiligt. Finanziell unterstützt wird das Projekt vom BMBF und von dem Förderverein für Biotechnologieforschung e.V. (FBF).

1.3 Mikrosatelliten als genetische Marker

Um zu überprüfen, ob ausgewählte Kandidatengene eine Rolle bei der unterschiedlichen Suszeptibilität der Schweine gegenüber einer *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infektion spielen, werden eng mit dem Kandidatengen gekoppelte polymorphe DNA Marker, in diesem Fall Mikrosatellitenmarker, verwendet, um eine eventuelle Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der Allelverteilung an dem entsprechenden Markerlocus nachweisen zu können.

Als Mikrosatelliten oder „short tandem repeats“ (STRs) werden DNA-Sequenzen bezeichnet, in denen sich einfache Basenmotive tandemartig wiederholen. Bereits 1984 wurde das Vorkommen solcher repetitiven Elemente in den meisten Säugergenomen beschrieben (Tautz und Renz 1984). Häufig handelt es sich um Di-, Tri- oder Tetranukleotidwiederholungen von weniger als 60bp in variabler Basenzusammensetzung. Besonders häufig sind allerdings CA bzw. GT-repeats im humanen Genom zu finden (Kruglyak et al. 1998).

Die Mikrosatelliten finden sich normalerweise in nicht codierenden Bereichen (Introns, intergenische Bereiche) über das gesamte Genom verteilt. Jüngere Untersuchungen haben allerdings ergeben, dass die Basenkomposition der DNA-Sequenz die Dichte von Mikrosatelliten beeinflusst. Bei Menschen und Mäusen kommen Mikrosatelliten häufig am Ende von Chromosomenarmen vor. Außerdem wurde auch in der Nähe von LINE und SINE-Elementen (Long bzw. Short interspersed nuclear element) und auf dem X-Chromosom ein gehäuftes Vorkommen von Mikrosatelliten beobachtet (Ellegren 2004).

Vier Klassen von Mikrosatelliten werden unterschieden (Weber 1990):

1. einfache, perfekte Wiederholungen, z.B. (CA)₁₀
2. einfache, nicht perfekte Wiederholungen, z.B. (CA)₁₀GT(CA)₆
3. zusammengesetzte, perfekte Wiederholungen, z.B. (CA)₈(TC)₁₀
4. zusammengesetzte, nicht perfekte Wiederholungen, z.B. (CA)₁₀T(GT)₈G(AC)₆

1989 fanden drei Arbeitsgruppen (Litt und Luty, Weber und May, Tautz und Renz) heraus, dass die Anzahl der Wiederholungseinheiten eines Mikrosatelliten bei unterschiedlichen Individuen variieren kann und Mikrosatelliten nach den

Mendelschen Regeln vererbt werden. Daher eignen sie sich als genetische Marker und finden heutzutage u.a. Anwendung bei der genetischen Kartierung (Roberts et al. 1999), in der Populationsgenetik (Taylor et al. 1994), in der Forensik (Sacchetti et al.) und bei Kopplungsanalysen bzw. Assoziationsstudien (Georges et al. 1993; Luikard et al. 2008).

Eine Hypothese besagt, dass Mikrosatelliten durch Insertionen bzw. Deletionen (InDels) während der DNA-Replikation entstehen, sogenannte „Slippage“-Ereignisse.

Zu „Slippage“-Ereignissen kann es kommen, wenn der DNA-Polymerase-Komplex während der Replikation von dem zu replizierenden Strang dissoziiert. Das terminale Ende des neu synthetisierten Stranges löst sich von dem zu replizierenden Strang und lagert sich an einer anderen Stelle wieder an, von wo aus die Replikation fortgeführt wird. Während dieses Vorgangs kann es sowohl bei dem neu synthetisierten Strang als auch auf dem Ausgangsstrang zur Formung sogenannter „Loops“ kommen. Nach Abschluss der Replikation korrigiert das „Mismatch“-Reparatursystem die Fehler durch Hinzufügen bzw. Herausschneiden von Wiederholungseinheiten. Im Laufe der Evolution kommt es zu wiederholten „InDel“-Ereignissen, die zusammen mit Punktmutationsereignissen zu der Alleldiversität bzw. den Längenpolymorphismen von Mikrosatelliten führen (Primmer CR, Ellegren H 1998; Ellegren 2004). Vielen Studien zufolge haben Dinukleotidrepeats die höchste Mutationsrate, gefolgt von Tri- und Tetranukleotidmotiven (Edwards et al. 1992; Valdes et al. 1993; Chakraborty et al. 1997; Kruglyak et al. 1998).

Seit 1993 ist das Phänomen der „Microsatellite Instability (MSI)“ bekannt (Thibodeau et al.). In Krebszellen wurde beobachtet, dass es durch ein mangelhaftes DNA „Mismatch“-Reparatursystem zu einer systematischen Anhäufung von unkorrekten Insertionen / Deletionen im Bereich repetitiver DNA kommt. Die fehlerhafte Replikation eines Mikrosatellitenmotivs in der Nähe eines Tumorsuppressorgens führt zu einer „Frameshift“-Mutation in diesem, was wiederum zu unkontrollierter Zellteilung und Tumorwachstum führt.

Über die ursprüngliche biologische Funktion der Mikrosatelliten ist allerdings wenig bekannt. Es wird vermutet, dass sie eventuell an der Genregulation beteiligt sind, da alternierende Purin- / Pyrimidinbasen (TG bzw. CA) in vitro in der Lage sind, Z-

Konformation anzunehmen, d.h. sie bilden eine linksgewundene DNA-Helix (Hamada und Kakunaga 1982). Da Antikörper linksgewundene DNA erkennen können (Stryer 1992), wäre auch eine Erkennung durch regulatorische Proteine in vivo denkbar.

1.4 Das Schweinegenomprojekt

Das Schweinegenom umfasst 18 Autosomen + 2 Geschlechtschromosomen und hat eine Größe von ungefähr $2,7 \times 10^9$ bp. Seit Beginn der 1990er Jahre wird von verschiedenen Forschergruppen an der Sequenzierung bzw. der Charakterisierung des Schweinegenoms gearbeitet. Zur Koordination der Arbeiten wurden zunächst das PiGMAP Programm des Roslin Institutes (Edinburgh) und das CSREES (Cooperative State Research, Education and Extension Service) Programm der USDA (United States Department of Agriculture) gegründet.

Seit 2003 bemüht sich das Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC) unter Beteiligung von Vertretern aus Forschung, Industrie und Regierung um die Koordination der Sequenzierungsarbeiten (Lawrence et al. 2005).

Das Sanger-Institut (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scrofa/) hat im Juli 2008 die neueste Version des partiell assemblierten porcinen Genoms veröffentlicht. Sie beinhaltet die Assemblierungen der Chromosomen 1, 2, 4-8, 10-15, 17 und X. Alle bisher zur Organisation des Schweinegenoms verfügbaren Daten sind auch über die NCBI oder die Pig-Pre-Ensembl Internetseite abrufbar (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9823 bzw. http://pre.ensembl.org/Sus_scrofa/index.html). Zu Beginn dieser Arbeit im Oktober 2005 gab es allerdings noch keine assemblierten Rohsequenzen des Schweinegenoms und auch die Pig-Pre-Ensembl Internetseite stand noch nicht zur Verfügung. Trotz des enormen Fortschritts der Sequenzierungsarbeiten in den letzten Jahren konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt nur relativ wenig Gene annotiert werden. Diese Tatsache erschwerte das Vorankommen des IRAS-Projektes enorm, da für einen Großteil der Kandidatengene keine Sequenzinformationen in den Datenbanken zur Verfügung standen.

1.5 Kandidatengene

Zu Beginn dieser Arbeit bestand die Aufgabe darin, geeignete Kandidatengene zu benennen, die möglicherweise die Suszeptibilität von Schweinen gegenüber Atemwegserkrankungen modulieren. Erarbeitet wurde eine Liste von Genen, die sich im wesentlichen in drei Kategorien einteilen lässt:

Der erste Block beinhaltet Gene, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie in Zusammenhang mit einer *A. pleuropneumoniae* Infektion bei Schweinen stehen. Z.B. konnten Hennig-Pauka et al. 2006 zeigen, dass die Konzentration des Cathelicidins PR39 in der Broncheo-Alveolar-Lavage-Flüssigkeit (BALF) 21 Tage nach einer *A. pleuropneumoniae* Infektion signifikant erhöht ist. Der zweite Block beinhaltet Gene, die im Verlauf anderer Projekte der Arbeitsgruppe Tümmler als Modulatoren für Cystische Fibrose identifiziert werden konnten, und somit auch als geeignete Kandidaten erachtet wurden, um eventuell den Krankheitsverlauf von Schweinen nach einer *A. pleuropneumoniae* Infektion zu modulieren. Als Beispiel seien zu nennen CD95 (Kumar et al. 2008) und TNFRSF1A (Stanke et al. 2006). Der dritte und umfangreichste Block umfasst Gene des angeborenen Immunsystems, die beim Menschen Einfluss auf die natürliche Krankheitsresistenz haben, z.B. Toll-like-Rezeptoren, Interferon-Rezeptoren und Tumornekrosefaktor-Rezeptoren.

Bei der Erarbeitung der Kandidatengenliste wurde vorausgesetzt, dass die Sequenzen der humanen und porcinen Gene untereinander sehr konserviert sind. Bereits 1988 haben Baldwin et al. gezeigt, dass das humane Transferrin und das porcine Transferrin zu 70% identisch sind. Außerdem wurde eine hohe Zahl von syntenischen Genombereichen zwischen Mensch und Schwein zugrundegelegt, d.h. die Reihenfolge der Gene auf den unterschiedlichen Chromosomen bei Mensch und Schwein ist in vielen Bereichen gleich. Diese Tatsache bildete die Grundlage dafür, mit Hilfe von bereits sequenzierten BAC-Endsequenzen, die auf dem menschlichen Genom abgebildet werden, porcine BAC-Klone mit dem gewünschten Kandidatengen identifizieren zu können, d.h. es wurde davon ausgegangen, dass auf der Länge von 100-300 kb (Größe eines BAC-Inserts) kein Bruch zwischen humanem und porcinem Genom stattfand.

Eine Übersichtskarte der bislang identifizierten syntenischen Bereiche zwischen Mensch und Schwein findet sich z.B. Yasue et al. (2008), bei Humphray et al. (2007) und auf der INRA-Internetseite (<http://www-lgc.toulouse.inra.fr/pig/compare/compare.htm>).

1.6 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgt drei Ziele, die im Folgenden beschrieben werden.

1.6.1 Markerentwicklung

Im Rahmen der vom BMBF ins Leben gerufenen Fördermaßnahme FUGATO (Funktionelle Genomanalyse im Tierischen Organismus) beschäftigt sich das Teilprojekt IRAS mit der Entwicklung von genetischen Markern zur Infektabwehr und Resistenz im Atemtrakt des Schweins. Atemwegserkrankungen bei Schweinen stellen ein großes wirtschaftliches Problem für Landwirte in Deutschland und Europa dar. Aufgrund fehlender Impfstoffe, die eine Kolonisation der Schweine mit den Hauptpathogenen *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* und Infuenza Virus verhindern, ist es von großem Interesse, genetische Marker zu identifizieren, die potentiell die Suszeptibilität von Schweinen gegenüber Atemwegsinfektionen modulieren.

Zu diesem Zweck werden zunächst für ausgewählte Kandidatengene informative Mikrosatellitenmarker entwickelt. Hohe Priorität kommt hierbei hauptsächlich Genen des angeborenen Immunsystems zu, aber auch Genen, die in direktem Zusammenhang mit einer *A. pleuropneumoniae* Infektion stehen und solchen, die in unserer Arbeitsgruppe bereits als Modulatoren für Cystische Fibrose identifiziert werden konnten.

1.6.2 Assoziationsstudie

Mit Hilfe dieser Marker wird eine Assoziationsstudie durchgeführt. Ein Vergleich der Allelverteilungen an den Markerloci von mild und schwer erkrankten Tieren (Deutsche Landrasse, Deutsches Edelschwein, Hampshire, Pietrain) nach *A. pleuropneumoniae* Infektion soll Aufschluss darüber geben, welche Gene bzw. Allele für die unterschiedliche Suszeptibilität der Tiere verantwortlich sind. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass für diese Art der Untersuchung keine Familienanalyse notwendig ist, da im Sinne einer „Fall-Kontroll-Studie“ lediglich mild mit schwer erkrankten Tieren verglichen werden. Die Auswertung der Daten erfolgt

mit Hilfe geeigneter Statistikprogramme. Für die Praxis könnte in der Zukunft auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit ein Gentest entwickelt werden, der eine gezielte Auswahl von unempfindlichen Herdlinientieren zur Zucht ermöglicht.

Die Infektionsversuche für diesen Teil der Studie und die anschließende Entwicklung eines Scoresystems zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung eines Tieres werden an der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt. In Vorarbeiten für dieses Projekt wurde bereits ein standardisiertes Infektionsmodell für *A. pleuropneumoniae* entwickelt. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass Rasseunterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion bestehen.

1.6.3 Diversitätsstudie

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung des derzeitigen Genpools unterschiedlicher Schweinepopulationen an den entwickelten Markerloci und der anschließende Vergleich der Allelverteilungen zwischen den verschiedenen Kohorten, um eventuell bereits bestehende Unterschiede in der Allelvielfalt an den Markerloci verschiedener Rassen zu identifizieren, ohne dass bisher bewusst auf Resistenz gezüchtet wurde.

Verglichen werden die Allelverteilungen von seltenen und/oder alten Schweinerassen (z.B. Leicoma und Schwäbisch-Hällische Schweine), Wildschweinen, Herdlinientieren eines Zuchtbetriebes, die derzeit zur Mastschweinezucht eingesetzt werden, und von Schweinefleischproben, die derzeit in Schlachtereien und Supermärkten deutschlandweit verkauft werden (Verbraucherstudie). Außerdem werden auch die Allelverteilungen der Tiere aus den Infektionsversuchen für den Vergleich herangezogen.

2 Methoden und Probenmaterial

Das folgende Schema gibt einen chronologischen Überblick über die einzelnen im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Arbeitsschritte. Zu jedem Schritt ist das Kapitel angegeben, in dem detaillierte Informationen zu dem entsprechenden Punkt zu finden sind.

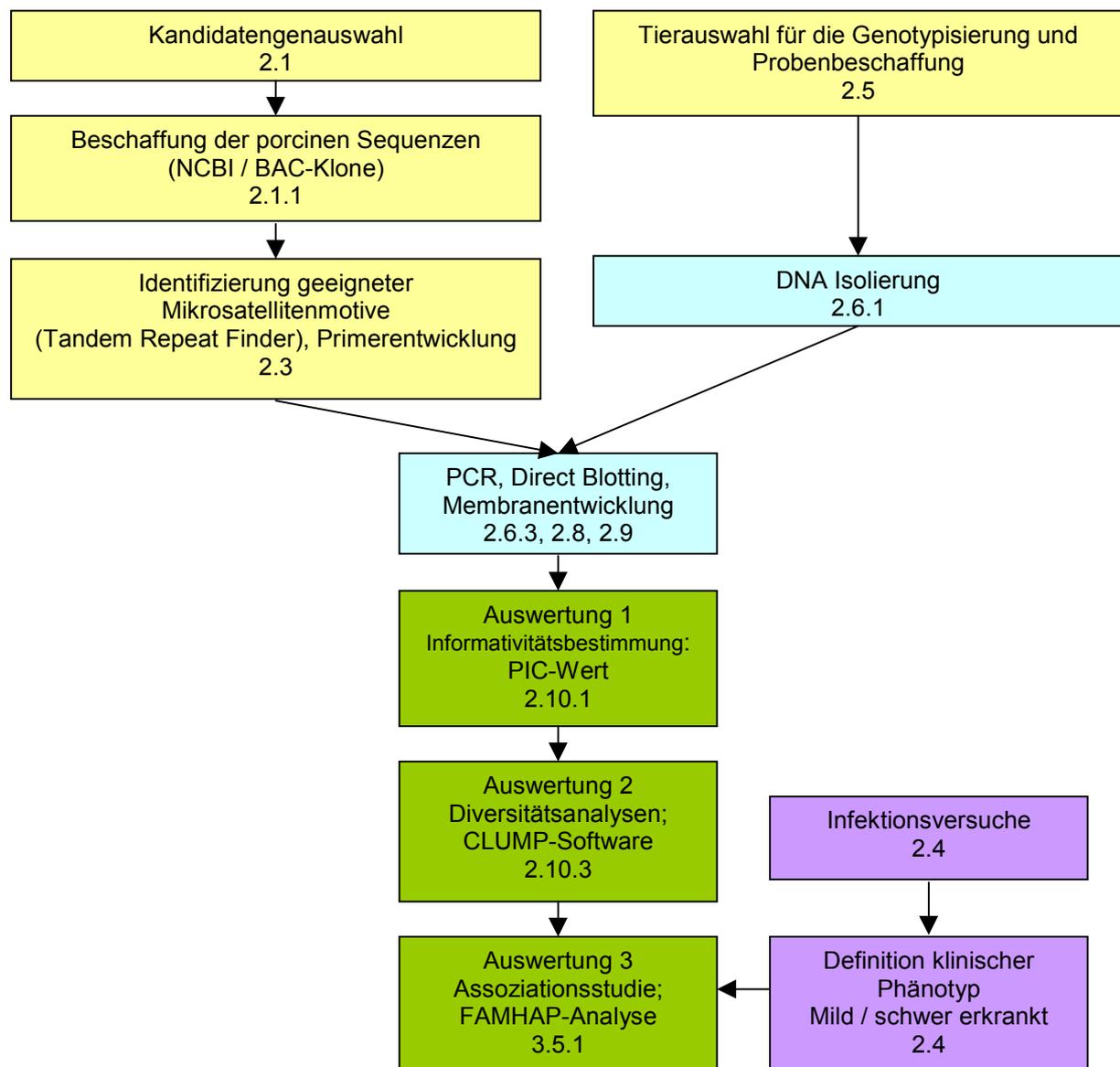


Abbildung 1: Überblick über den Projektablauf

Aus dem Schema geht hervor, dass sich die einzelnen Arbeitsschritte in vier Kategorien einteilen lassen. Vor Beginn des praktischen Teils der Arbeit war es zunächst notwendig, Kandidatengene und

die zugehörige porcine Sequenz zu ermitteln, innerhalb der Sequenz Mikrosatellitenmotive zu identifizieren, geeignete Tiere für die nachfolgende Genotypisierung auszuwählen und die Proben zu beschaffen (gelb hinterlegt). Darauf folgte die Laborarbeit (blau hinterlegt), d.h. die Amplifikation der Mikrosatelliten und anschließende Analyse mittels Direct-Blotting Elektrophorese und Chemilumineszenzdetektion. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe verschiedener statistischer Verfahren (grün hinterlegt). Die Infektionsversuche und die anschließende Phänotypisierung zur Diskriminierung von mild bzw. schwer erkrankten Tieren wurden an der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt; die Auswertung erfolgte durch Frau Doris Höltig.

2.1 Kandidatengene

Wie eingangs bereits erwähnt, wurde zu Beginn des IRAS-Projektes in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Tosso Leeb eine 102 Gene umfassende, nach Priorität sortierte Liste mit Kandidatengenen erarbeitet, die potentiell die Suszeptibilität von Schweinen gegenüber einer *A. pleuropneumoniae* Infektion modulieren. Ziel dieser Arbeit war es, für die ersten 48 Gene der Liste Mikrosatellitenmotive zu identifizieren und entsprechend als Marker zu etablieren.

Tabelle 1: Kandidatengenübersicht

Nr.	Genname	Kurzbeschreibung
1	TNFRSF1A; tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	Das codierte Protein ist einer der Hauptrezeptoren für den Tumornekrosefaktor alpha. Der Rezeptor aktiviert den Transkriptionsfaktor NF-kB, vermittelt Apoptose und ist ein Regulator für Inflammation.
2	Tyk2; Tyrosine kinase 2	Die Tyrosin-Kinase2 gehört zur Familie der Janus-Kinasen und ist Teil der JAK/STAT Signalkaskade. Das Protein ist assoziiert mit der cytoplasmatischen Domäne von Typ I und Typ II Cytokinrezeptoren und leitet durch Phosphorylierung der Rezeptoruntereinheiten Cytokinsignale weiter.
3	CD14; Cluster of differentiation antigen 14	CD14 ist ein membranassoziiertes Protein, das speziell auf der Oberfläche von Makrophagen exprimiert wird. Zusammen mit MD2 und TLR4 ist es ein Co-Rezeptor für die Erkennung von bakteriellen Lipopolysacchariden („pattern recognition receptor“)
4	CD95 (FAS;TNFRSF6); tumor necrosis factor receptor superfamily member 6	CD95 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Apoptose. Zusammen mit seinen Liganden formt der Rezeptor den sogenannten „death inducing signalling complex“. CD95 ist beteiligt an der Pathogenese von Immunkrankheiten.
5	BPI; Bactericidal/permeability- increasing protein	Das codierte Protein bindet Lipopolysaccharide. Es ist assoziiert mit humanen neutrophilen Granulozyten, hat eine bakterizide Wirkung auf gram-negative Organismen und neutralisiert Endotoxine.
6	TF Transferrin	Das im Blutplasma vorkommende Glykoprotein Transferrin bindet pH abhängig reversibel Eisen III-Ionen und versorgt damit alle proliferierenden Zellen des Körpers.
7	TFR1 Transferrinrezeptor1	Die mit Eisen-Ionen beladenen Transferrinproteine binden an den Transferrinrezeptor1 (Transmembranprotein) an der Zelloberfläche und werden so in Vesikeln in die Zelle transportiert.

Nr.	Genname	Kurzbeschreibung
8	TFR2 Transferrinrezeptor2	Der humane Transferrinrezeptor 2 ist ein Typ II Membranprotein und reguliert ebenfalls die Eisenaufnahme in die Zelle. Bei Schweinen ist bislang nur ein Transferrinrezeptor bekannt.
9	pBD-1 porcines Beta-Defensin-1	Das porcine Beta-Defensin-1 ist ortholog zu dem humanen Beta-Defensin 2. Defensine bilden eine Familie antimikrobiell und cytotoxisch wirkender Peptide, die von Neutrophilen produziert werden.
10	PR39 (FALL39;CAMP) Cathelicidin antimicrobial peptide	Cathelicidine bilden eine Familie antimikrobisch wirkender Polypeptide. CAMP wurde in speziellen Granula von polymorphonuklearen Leukozyten (PMNs) gefunden.
11	PG-1 Protegrin 1	Protegrin-1 ist ein antimikrobiell wirkendes Protein, das aus porcinen Leukozyten isoliert wurde.
12	TLR1 Toll-like receptor 1	Das Proteine TLR1-10 gehören zur Familie der Toll-like-Rezeptoren, die eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von Pathogenen und der anschließenden Aktivierung des angeborenen Immunsystems spielen. Sie erkennen sog. „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) und vermitteln dadurch die Produktion von Cytokinen. TLR1 wird auf Makrophagen und Neutrophilen exprimiert und erkennt zusammen mit TLR2 als Heterodimer Peptidoglykan und Lipoproteine gram-positiver Bakterien. TLR3 erkennt doppelsträngige RNA viralen Ursprungs. TLR4 erkennt über die Co-Rezeptoren CD14 und MD2 Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer Bakterien. TLR5 erkennt bakterielles Flagellin (Bestandteil der Flagellen und Virulenzfaktor). Die TLR5 Aktivierung stimuliert den Transkriptionsfaktor NF- κ B und stimuliert die Produktion von TNF-alpha. TLR6 interagiert mit TLR2 und stimuliert die zelluläre Immunantwort auf Lipoproteine von Mycoplasmen. TLR7 und TLR8 erkennen u.a. Einzelstrang RNA. TLR9 erkennt unmethylierte CpG-Dinukleotide in bakterieller DNA. Der Ligand für TLR10 ist bislang unbekannt.
13	TLR2 Toll-like receptor 2	
14	TLR3 Toll-like receptor 3	
15	TLR4 Toll-like receptor 4	
16	TLR5 Toll-like receptor 5	
17	TLR6 Toll-like receptor 6	
18	TLR7 Toll-like receptor 7	
19	TLR8 Toll-like receptor 8	
20	TLR9 Toll-like receptor 9	
21	TLR10 Toll-like receptor 10	
22	SARM1 Sterile alpha and TIR motif containing 1	SARM1 gehört zu einer Gruppe von 5 Adaptorproteinen, die an den TLR-Signalkaskaden beteiligt sind. Alle diese Proteine tragen eine TIR (toll-interleukin 1-receptor) Domäne. SARM ist ein negativer Regulator des TLR-Signalwegs (Carty et al. 2006).
23	TNFRSF1B tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	Das Protein TNFRSF1B bildet zusammen mit TNFRSF1A einen Heterokomplex, der die Rekrutierung von zwei anti-apoptotischen Proteinen (c-IAP1 und c-IAP2) vermittelt. Über die Bindung von TNF und der nachfolgenden Signalkaskade induziert es Apoptose.
24	IFNGR1 Interferon gamma receptor 1	Der humane Interferon-gamma-Rezeptor ist ein Heterodimer aus IFNGR1 und IFNGR2. IFNGR1 bildet dabei die Ligand-Bindedomäne. Mutationen im humanen IFNGR1 Gene sind assoziiert mit veränderter Suszeptibilität gegenüber bakteriellen Infektionen.
25	IFNAR1 Interferon alpha receptor 1	IFNAR1 ist ein Typ I Membranprotein und bildet zusammen mit IFNAR2 Rezeptors für Interferon alpha und beta. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt die Auslösung der JAK/STAT Signalkaskade.
26	IFNGR2 Interferon gamma receptor 2	Siehe IFNGR1
27	IL12RB1 Interleukin 12 receptor, beta 1	Das codierte Protein ist ein Typ I Membranprotein und bildet wahrscheinlich zusammen mit IL12RB2 Proteinen einen Rezeptorkomplex zur effektiven Bindung von IL12. Zusammen mit IL23R bindet es außerdem IL23.

Nr.	Genname	Kurzbeschreibung
28	CXCR2 (IL8RB) Interleukin 8 receptor beta	Das Protein bindet zum einen IL8 und aktiviert die anschließende Signaltransduktionskaskade, zum anderen bindet es den Chemokinliganden 1 (CXCL1), ein Zytokin, das das Wachstum von Melanomzellen aktiviert. Der Rezeptor vermittelt außerdem die Migration von Neutrophilen zu Inflammationsherden.
29	IL12RB2 Interleukin 12 receptor beta 2	Siehe IL12RB1
30	IL18R1 Interleukin 18 receptor 1	Das Protein gehört zu einem Zytokinrezeptorkomplex der Interleukin 1 Rezeptorfamilie. Es bindet spezifisch Interleukin 18 und vermittelt die nachfolgende Signaltransduktion.
31	IL23R Interleukin 23 receptor	Das Protein bildet eine Untereinheit des Rezeptors für IL23A. Zusammen mit IL12RB1 ist es verantwortlich für die durch IL23A aktivierte Signalkaskade. Außerdem ist es konstitutiv mit der Januskinase 2 (JAK2) assoziiert und bindet an den Transkriptionsfaktor STAT3.
32	TNFRSF4 tumor necrosis factor receptor superfamily member 4	Das Protein aktiviert durch Interaktion mit Adaptorproteinen den Transkriptionsfaktor NF-κB. Außerdem wird vermutet, dass er die Expression von Apoptoseinhibitoren aktiviert und so Apoptose unterdrückt.
33	CD40 (TNFRSF5) Cluster of differentiation antigen 40	Das Protein der TNF-Rezeptor-Superfamilie ist ein costimulatorisches Protein exprimiert auf Makrophagen. Diese werden durch die Bindung von den auf T-Zellen exprimierten Liganden CD40L aktiviert.
34	TNFRSF6B tumor necrosis factor receptor superfamily member 6B	Das Protein hat eine regulatorische Funktion bei der Unterdrückung von Apoptose, indem es bezüglich der Ligandenbindung in Konkurrenz mit „Todesrezeptoren“ tritt.
35	TNFRSF7 tumor necrosis factor receptor superfamily member 7	Das Protein bindet den Liganden CD70 und spielt eine wichtige Rolle bei der B-Zell-Aktivierung und Immunglobulinsynthese. Außerdem kann das proapoptotische Protein SIVA an den Rezeptor binden und so Apoptose induzieren.
36	TNFRSF8 tumor necrosis factor receptor superfamily member 8	Das Protein wird von aktivierten T und B-Zellen exprimiert und ist ein positiver Regulator der Apoptose.
37	TNFRSF9 tumor necrosis factor receptor superfamily member 9	Das Protein trägt zur klonalen Expansion, dem Überleben und der Entwicklung von T-Zellen bei und kann über die Bindung von Adapterproteinen NF-κB aktivieren.
38	TNFRSF10A tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A	Beide Proteine binden den Apoptose induzierenden Liganden TNFSF10. Die so induzierte Signalkaskade induziert Apoptose.
39	TNFRSF10B tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B	
40	TNFRSF10C tumor necrosis factor receptor superfamily member 10C	Das Protein besitzt eine extrazelluläre und eine Transmembrandomäne aber keine cytoplasmatische Domäne, über die Apoptose induziert werden könnte. Daher wird vermutet, dass dieser Rezeptor antagonistisch wirkt und die Zelle vor Apoptose schützt.

Nr.	Genname	Kurzbeschreibung
41	TNFRSF10D tumor necrosis factor receptor superfamily member 10D	Das Protein besitzt zwar eine verkürzte cytoplasmatische Domäne, die keine Apoptose induzieren kann. Daher hat auch dieser Rezeptor eine inhibitorische Funktion in Bezug auf Apoptose.
42	TNFRSF11A tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A	Dieser Rezeptor und seine Liganden spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Interaktionen zwischen T-Zellen und Dendritischen Zellen. Außerdem spielt er eine Rolle bei der Osteoclasten (Knochen resorbierende Zellen) und Lymphknotenentwicklung.
43	TNFRSF11B tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	Das Protein wird von Osteoblasten segregiert und wirkt als negativer Regulator bei der Knochen-Resorption.
44	TNFRSF12A (TWEAKR) tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A	Das Protein ist der Rezeptor für das Protein „TNF-like weak inducer of apoptosis“ (TWEAK)
45	TNFRSF18	Der Rezeptor wird verstärkt exprimiert nach T-Zell Aktivierung und spielt eine Rolle bei der Apoptose.
46	TNF alpha; Tumor necrosis factor alpha	Das Protein ist ein multifunktionales, proinflammatorische Zytokin, das hauptsächlich von Makrophagen abgesondert wird. Es bindet an die Rezeptoren TNFRSF1A und 1B.
47	TNF beta (LTA); Tumor necrosis factor beta; Lymphotoxin alpha	Das Protein ist ein von Lymphozyten produziertes Zytokin und liegt als homotrimerisches Molekül vor.
48	NRAMP1; natural resistance- associated macrophage protein 1	Das Protein reguliert die intrazelluläre Proliferation von Pathogenen und die Immunantwort von Makrophagen bei Infektion (Barton et al. 1999). Außerdem fungiert es als Eisen und Mangantransporter.

Die grau hinterlegten Gene wurden ausgewählt, da sie im Rahmen von Studien unserer Arbeitsgruppe bereits als Modulatoren für Mukoviszidose identifiziert werden konnten (Stanke et al. 2006; Kumar et al. 2008; Dissertation V. Kumar 2007).

Die Tyrosinkinase2 wurde aufgrund des Vorschlags von Herrn Prof. T. Leeb als Kandidatengen hoher Priorität ausgewählt, da seine Arbeitsgruppe seit mehreren Jahren intensiv das porcine Tyk2 Protein untersucht und das entsprechende porcine Gen sequenziert hat (Leeb et al. 2004).

Für die grün hinterlegten Gene wird aus folgenden Gründen vermutet, dass sie eine Rolle für die unterschiedliche Suszeptibilität von Schweinen gegenüber Atemwegsinfektionen spielen:

1. Transferrin / Transferrinrezeptoren

Im Verlauf früherer Studien der Arbeitsgruppe Gerlach (Baltes et al. 2002) konnte gezeigt werden, dass beide von *A. pleuropneumoniae* produzierten Transferrinrezeptoren eine entscheidende Rolle für die Virulenz der Bakterien spielen. Die Rezeptoren haben eine hohe Affinität zu porcinem Transferrin und die Bakterien sichern ihre Eisenversorgung, indem sie es das mit Eisen beladene porcine Transferrin an ihre eigenen Rezeptoren binden. Die Vermutung ist nun, dass eventuelle Mutationen im porcinen Transferrin bzw. des porcinen Transferrinrezeptors dazu führen, dass die Bakterien nicht mehr oder in geringerem Maße in der Lage sind, das porcine Transferrin für ihre Eisenversorgung zu nutzen.

2. PR39

Für das Cathelicidin PR39, ein antimikrobiell wirkendes Protein, konnte bereits gezeigt werden, dass es in der BALF (broncho-alveolar-fluid) von chronisch mit *A. pleuropneumoniae* infizierten Schweinen in erhöhten Konzentrationen vorkommt (Hennig-Pauka et al. 2005).

3. pBD-1

Elahi et al. haben 2006 gezeigt, dass der Schutz von älteren Ferkeln (älter als vier Wochen) gegenüber einer Infektion mit *Bordetella pertussis* in direktem Zusammenhang mit der Expression von pBD-1 im oberen Respirationstrakt steht. Neugeborene Ferkel exprimieren noch kein pBD-1 und waren in den durchgeführten Infektionsversuchen voll suszeptibel, während ältere Ferkel mit pBD-1 Expression keine Krankheitssymptome zeigten. Durch die Behandlung neugeborener Ferkel mit pBD-1 zum Zeitpunkt der Infektion konnte ebenfalls ein Schutz erreicht werden.

4. PG-1

Für das Protegrin-1 aus porcinen Lymphozyten konnte in vitro bereits eine antimikrobielle Wirkung gegenüber einer Reihe von Mikroorganismen (u.a. *Pseudomonas aeruginosa*) nachgewiesen werden (Steinberg et al. 1997). Außerdem konnte mit Hilfe von PG-1 die Kolonisation von *P. aeruginosa* in Hautwunden bei Schweinen verhindert werden (Ceccarelli et al. 2001).

Die meisten Kandidatengene jedoch wurden ausgewählt, da sie zum angeborenen Immunsystem gehören und damit generell eine entscheidende Rolle bei der ersten Abwehr gegen eindringende Pathogene spielen (gelb hinterlegt).

2.1.1 Sequenzbeschaffung zu Kandidatengen

Voraussetzung für die Identifizierung geeigneter Mikrosatellitenmotive war die Verfügbarkeit der porcinen Sequenz des jeweiligen Kandidatengens. Für 12 der 48 Gene waren in der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) porcine Sequenzen verfügbar, die als Marker etablierbare Repeatmotive enthalten. Für die übrigen Gene wurden in Zusammenarbeit mit dem HZI Braunschweig mit Hilfe der Ensembl-Datenbank (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html) porcine BAC-Klone identifiziert, die wahrscheinlich das gewünschte Gen enthielten. Die Ensembl-Datenbank nutzt hierfür einen BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Algorithmus, der bereits sequenzierte BAC-Endsequenzen auf dem menschlichen Genom abbildet. Die im menschlichen Genom bekannte Position des jeweiligen Kandidatengens ermöglichte es, sich für jedes Gen die BAC-Endsequenzen anzeigen zu lassen, für die innerhalb bzw. in der Nähe des Gens mit Hilfe der BLAST-Analysen eine Übereinstimmung mit der humanen Sequenz gefunden wurde. Durch die große Homologie zwischen Mensch und Schwein konnte davon ausgegangen werden, dass auch die porcine Sequenz des BACs zwischen den Endsequenzen das Gen enthält, das im humanen Genom an dieser Position liegt. Die auf diese Weise identifizierten BAC-Klone (siehe 3.1.1) wurden bei entsprechenden Anbietern bestellt (siehe 6.1.7 im Anhang) oder von Herrn Prof. T. Leeb zur Verfügung gestellt und anschließend am HZI Braunschweig sequenziert (alle Sequenzen werden der Arbeit auf CD-Rom beigefügt). Dazu wurden die BAC-Klone zunächst subkloniert und einige der Subklone anschließend nach dem Zufallsprinzip sequenziert. Bei den für die Markerentwicklung verwendeten Sequenzen handelte es sich folglich um unassemblierte Sequenzstücke (ca. 100.000 bp pro Klon) der ursprünglichen BAC-Klone. Mit Hilfe von Ähnlichkeitsvergleichen (BLAST) wurde sichergestellt, dass die porcinen BAC-Sequenzen tatsächlich das gewünschte Gen enthalten. Hierfür wurde die mRNA-Sequenz des homologen humanen Gens bzw. falls verfügbar des porcinen Gens als Vergleichssequenz

eingesetzt. Als positives Ergebnis wurde gewertet, wenn für mindestens fünf ca. 200 bp große Sequenzstücke eine Sequenzidentität > 80% gefunden wurde. Zusätzlich wurden von Herrn Prof. T. Leeb an der Universität Bern freundlicherweise weitere BLAST-Analysen durchgeführt, wobei die am HZI generierten Sequenzen der porcinen BACs mit dem gesamten menschlichen Genom verglichen wurden. Falls die Contigs der porcinen BAC-Sequenzen in der genomischen Region beim Menschen wiederzufinden waren, auf der das gewünschte humane Homolog zu dem gewünschten Kandidatengens liegt, und es keine weiteren Übereinstimmungen über das gesamte humane Genom verteilt gab, wurde als bestätigt angenommen, dass der ausgewählte BAC-Klon die Sequenz des gewünschten Kandidatengens enthielt.

2.2 BAC-Kultivierung

Alle verwendeten porcinen Klone waren in den BAC-Vektor pBeloBAC 11 von Invitrogen kloniert worden und wurden als Stabkulturen in LB-Agar mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol als Selektionsantibiotikum geliefert.

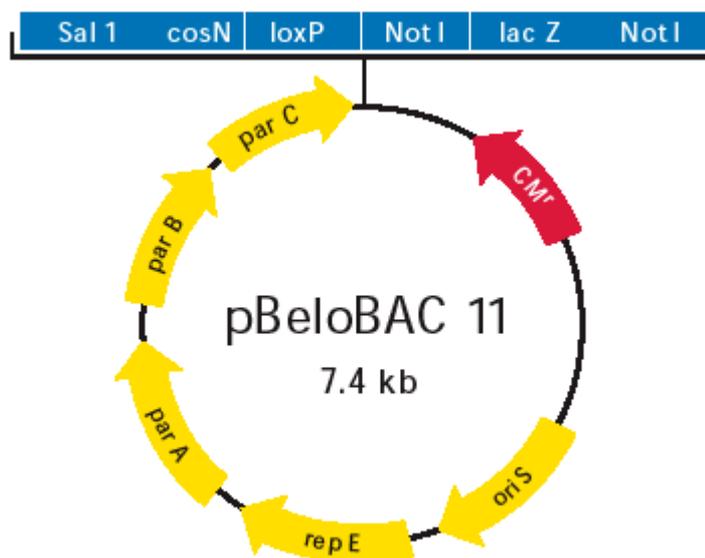


Abbildung 2: Karte des pBeloBAC 11- Vektors

CM: Chloramphenicol-acetyl-Transferase; vermittelt Chloramphenicolresistenz (rot)

Par A, par B, par C: Sequenzen, die die Kopienzahl der Vektor DNA kontrollieren

Rep E: kontrolliert die Plasmidreplikation

Ori S: Replikationsstartpunkt

Sal1; cosN; loxP; Not 1; lacZ, Not 1: Polylinker; Abschnitt des Vektors, der neben verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme auch das lacZ Gen als Markergen enthält; innerhalb dieses Abschnittes kann nach Wahl des geeigneten Restriktionsenzym das gewünschte Insert einkloniert werden.

Der Vektor inklusive Insert wiederum war in den *E. coli* Stamm DH10 einkloniert.

Zur langfristigen Lagerung der Klone wurde zunächst Bakterienmaterial aus den Stabkulturen mit einer Impföse auf frisch hergestellte LB-Agarplatten mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Das Bakterienmaterial einer halben Platte wurde anschließend mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens in ein vorher vorbereitetes Kryoröhrchen mit Einfriermedium (LB-Medium mit 10 -15% Glycerin) überführt und bei -80°C eingefroren.

2.3 Identifizierung geeigneter Mikrosatellitenmotive

Potentiell als Mikrosatellitenmarker geeignete Repeatmotive in den Sequenzen der Kandidatengene wurden mit Hilfe des Programms „Tandem Repeat Finder“ detektiert (Benson 1999). Für jedes Gen wurden aus der erhaltenen Liste alle nicht unterbrochenen Motive mit mindestens sechs Wiederholungseinheiten ausgewählt und Primer (siehe 6.4 im Anhang) entwickelt. Anschließend wurden die Motive nacheinander dem PCR-Optimierungsprozess (siehe 2.6.3) unterzogen, um sie als Marker zu etablieren. Die parallele Optimierung mehrerer Primerpaare führte dazu, dass für einige Kandidatengene mehrere Marker etabliert werden konnten. Der Marker mit dem höchsten PIC-Wert wurde anschließend für die Genotypisierungen verwendet.

Da die Erfahrungen in unserem Labor gezeigt haben, dass einer Primärsequenz im Vorfeld nicht angesehen werden kann, ob sie als Marker etablierbar ist, konnte keine Vorauswahl der identifizierten Mikrosatellitenmotive für den Optimierungsprozess getroffen werden.

In nur fünf Fällen konnte gleich die erste getestete Sequenz für ein Gen als Marker etabliert werden, während für andere Gene alle verfügbaren Repeatmotive (bis zu

acht) getestet wurden, ohne einen geeigneten Marker für eine Hochdurchsatz-Genotypisierung etablieren zu können (siehe 3.1.1).

2.4 Infektionsversuche und Phänotypisierung

Um mit Hilfe von polymorphen Mikrosatellitenmarkern Gene identifizieren zu können, die den Schweregrad der Pneumonieerkrankung nach einer Atemwegsinfektion modulieren, war es zunächst notwendig, mit Hilfe eines standardisierten Aerosolinfektionsmodells (Baltes et al. 2001) einen detaillierten Phänotyp lungenkranker Bestände zu definieren. Als Modellorganismus für die Infektionsversuche diente der gut charakterisierte Serotyp 7 Stamm AP76 von *A. pleuropneumoniae*, der bereits in vorangehenden Studien zu Bakterien-Wirt-Interaktionen verwendet wurde (z.B. Hennig-Pauka et al. 2006). Er zeichnet sich durch eine geringe Pathogenität aus und verursacht vor allem chronische Erkrankungsbilder.

Bei *A. pleuropneumoniae* handelt es sich um ein gram-negatives Stäbchen. Er gehört zur Familie der *Pasteurellaceae* und ist ein obligater Parasit des porcinen Respirationstraktes. Bislang wurden 18 verschiedene Serotypen identifiziert, die sich sowohl in der Struktur ihrer oberflächlichen Kapselantigene unterscheiden als auch in der Zusammensetzung des in der Bakterienwand lokalisierten Lipopolysaccharids (LPS). Die Kapselantigene und die Lipopolysaccharide stellen wesentliche Virulenzfaktoren dar. Hinzu kommen von den Bakterien produzierte Exotoxine. Prinzipiell sind alle Serotypen in der Lage, eine Pleuropneumonie beim Schwein auszulösen (Bosse et al. 2002). Für den Serotyp 7 konnte gezeigt werden, dass beide transferrinbindenden Proteine eine wesentliche Rolle für die Virulenz spielen (Baltes et al. 2002).

Im Rahmen eines Teilprojektes von IRAS wurde an der Klinik für kleine Klautiere und forensische Medizin und Ambulatorische Klinik (Tierärztlichen Hochschule Hannover; Prof. Waldmann) von Frau Doris Höltig ein Ranking-System entwickelt, das es ermöglicht, die unterschiedlichen Ausprägungen einer Pneumonieerkrankung am lebenden Tier beurteilen zu können. Hierfür wurden die Untersuchungsergebnisse der bildgebenden Verfahren Ultraschall und Röntgen und

die Ergebnisse des sogenannten „Klinischen Scores“, in den 11 täglich erhobene Untersuchungsparameter wie z.B. Verhaltensauffälligkeiten und Atemfrequenz eingehen, rechnerisch zusammengefasst. Dieses Rankingverfahren ermöglichte eine individuelle Einordnung jedes untersuchten Tieres in eine Schweregradreihenfolge, wobei ein höherer Rankingwert gleichbedeutend ist mit einem höheren Erkrankungsgrad des Tieres. Insgesamt wurden 100 Tiere aus den Infektionsversuchen mit diesem Rankingverfahren beurteilt. Das Ranking ermöglicht die Einteilung der Tiere in mild bzw. schwer erkrankt (siehe 2.4) und bildet damit die Grundlage für die angestrebte Assoziationsstudie mit Hilfe der entwickelten Mikrosatellitenmarker, bei der untersucht werden soll, ob ein bestimmter Genotyp bzw. ein bestimmtes Allel an einem Markerlocus assoziiert ist mit dem Phänotyp mild bzw. schwer erkrankt nach *A.pleuropneumoniae* Infektion.

Voraussetzung für die Etablierung dieses Lebendscores war der Befund, dass die Rankingwerte signifikant korrelierten mit den Ergebnissen des am Ende der Versuche erhobenen Lungensektionsscores, d.h. Tiere die nach Lebendscore als mild erkrankt eingestuft worden waren, zeigten auch keine wesentlichen Lungenveränderungen, während als schwer erkrankt eingestufte Tiere stark veränderte Lungen aufwiesen.

Genauere Informationen zur Berechnung der Rankingwerte und der Versuchsabläufe sind der Dissertation „Vergleichende klinische Untersuchungen an Ferkeln der Rassen Deutsche Landrasse, Hampshire, Pietrain und Large White hinsichtlich unterschiedlicher Erkrankungsgrade nach einer Aerosolinfektion mit *A. pleuropneumoniae*“ von Frau Doris Höltig zu entnehmen.

2.5 Probenmaterial für die Genotypisierung

Dieses Kapitel enthält sowohl eine Übersicht über alle für die Genotypisierung verwendeten Schweinerassen als auch Informationen über die Zusammensetzung der einzelnen Kohorten für die verschiedenen Fragestellungen dieser Arbeit.

2.5.1 Die Schweinerassen

Die folgenden Unterkapitel enthalten jeweils Kurzinformationen zu allen verwendeten Schweinerassen.

Weiterführende Informationen sind u.a. auf folgenden Internetseiten verfügbar:

Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V.

(<http://www.g-e-h.de/>)

Schweinefreunde e.V. (<http://www.schweinefreunde.de/>)

Vieh e.V. (<http://www.vieh-ev.de/Rassen/schweine.html>)

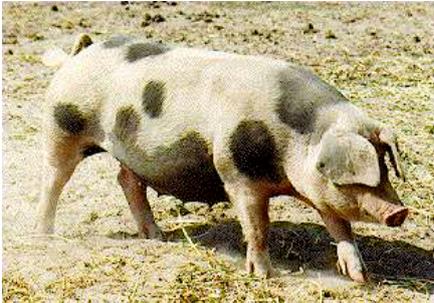
2.5.1.1 Angler-Sattelschwein



(<http://www.g-e-h.de/geh-raku/schweine/schwang.htm>)

Das Angler-Sattelschwein stammt aus Angeln in Schleswig-Holstein und geht zurück auf ein unveredeltes, schwarzbuntes Landschwein, das durch die Einkreuzung von englischen Ebern veredelt wurde. Das Sattelschwein wird seit 1929 im Herdbuch geführt und ist seit 1937 als Rasse anerkannt. Da es sich um ein sogenanntes Fettschwein handelt, ging seine Bedeutung ab den 1960er Jahren aufgrund der zunehmenden Nachfrage nach fettarmem Schweinefleisch zurück. Heute gilt die Rasse als extrem gefährdet und steht auf der Roten Liste der Gesellschaft alter und gefährdeter Haustierrassen (Benecke 1994)

2.5.1.2 Bunte-Bentheimer



(<http://www.g-e-h.de/geh-schweine/BILDER/S41.jpg>)

Das Bunte Bentheimer-Schwein stammt aus der Grafschaft Bentheim und dem Emsland. Es entstand durch die Einkreuzung von Berkshire-Ebern und Cornwallschweinen aus England Mitte des 19. Jahrhunderts in das Europäische Landschwein. Wie auch das Angler-Sattelschwein verlor es Mitte der 1960er Jahre seine Bedeutung aufgrund seines hohen Fettanteils im Fleisch. Das Überleben der Rasse wurde durch einen einzigen Züchter in der Grafschaft Bentheim gesichert. Trotzdem zählt es heute immer noch zu einer der extrem gefährdeten Rassen.

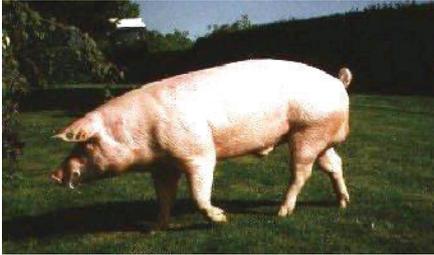
2.5.1.3 Deutsches Edelschwein (Large White)



(<http://www.aid.de/landwirtschaft/tierspecial/schweinerassen/images/deutschesedelschwein.jpg>)

Das Deutsche Edelschwein ist seit 1904 offiziell als Rasse anerkannt und geht zurück auf eine Kreuzung von englischen Yorkshire (Large White) und Middle Whites in das Europäische Landschwein in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts. Die Sauen werden aufgrund der guten Fleischbeschaffenheit der Rasse häufig eingesetzt für die Züchtung von Hybridschweinen und zur Mastferkelzucht.

2.5.1.4 Deutsche Landrasse



(<http://www.everinghoff.de/glandeb.jpg>)

Die Deutsche Landrasse wurde 1969 als offizielle Rasse anerkannt. Vorläufer der Rasse waren Ende des 19. Jahrhunderts Kreuzungen aus Europäischen Landschweinen mit englischen Yorkshire Schweinen, die durch Einkreuzung von dänischen Schweinerassen weiter veredelt wurden zur heutigen Deutschen Landrasse. Die Deutsche Landrasse wird heute wie das Deutsche Edelschwein hauptsächlich eingesetzt zur Erzeugung von Hybridschweinen in der Mastschweinzucht.

2.5.1.5 Hampshire



(<http://www.schweinefreunde.de/schweine/schweine-rassen/bilder/hampshire.jpg>)

Die Hampshire Schweine stammen von britischen Sattelschweinen aus der Grafschaft Hampshire ab, die 1825 in die USA importiert wurden. 1904 wurde sie als offizielle Rasse anerkannt und ist in Nordamerika die häufigste Schweinerasse. In Europa kommt sie hauptsächlich zum Einsatz zur Erzeugung von Hybridebern (häufig Kreuzung mit Pietrain) für die Mastschweinproduktion.

2.5.1.6 Leicoma



(http://www.tiho-hannover.de/einricht/zucht/eaap/photos/965_2l.jpg)

Bei den Leicoma Schweinen handelt es sich um eine synthetische Linie, die ursprünglich ab ca. 1971 in der ehemaligen DDR im Rahmen des Hybridschweinezuchtprogramms gezüchtet wurde. Erst 1985 wurden die Leicoma Schweine als Rasse anerkannt. Der Name stammt von den drei Bezirken Leipzig-Cottbus-Magdeburg. Für die Rasse wurden die Deutsche und Niederländische Landrasse, Duroc, Estnisches Speckschwein und Deutsches Sattelschwein gekreuzt. Die Rasse wird heute noch von Zuchtverbänden in Brandenburg, Mecklenburg, Sachsen-Anhalt und Thüringen eingesetzt und dient der Erzeugung von Hybridmuttersauen (durch Kreuzung mit Deutscher Landrasse oder Deutschem Edelschwein) für die Mastschweinzucht.

2.5.1.7 Mangalitza (Wollschwein)



(http://blog.zeit.de/schwein_und_co/wp-content/uploads/2006/05/RotesMangalitza05.JPG)

Die Mangalitza-Schweine entstanden Anfang des 20. Jahrhunderts ursprünglich in Ungarn durch Kreuzung von serbischen Sumadia-Schweinen mit Szalantai-Schweinen, einer damals in Ungarn weit verbreiteten Rasse. Sie wurden 1927 als

Rasse anerkannt und waren bis in die 1960er Jahre die vorherrschende Rasse in Ungarn. In den 1970iger Jahren wurden sie von englischen, magerfleischigen Schweinerassen verdrängt, da ihr fettreiches Fleisch nicht mehr den Verbraucheransprüchen entsprach. Heute werden sie nur noch von wenigen Kleinzüchtern u.a. in Ungarn und Deutschland gehalten und gelten als extrem gefährdete Rasse.

2.5.1.8 Mini-Lewe



(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/agrar/otto-grit/HTML/object13.gif>)

Das Mini-Lewe wurde in den 1970er Jahren an der Sektion Tierproduktion und Veterinärmedizin der Humboldt-Universität in Berlin gezüchtet. Dazu wurden das Vietnamesische Hängebauchschwein, das Deutsche Sattelschwein und das Deutsche veredelte Landschwein gekreuzt (Gregor et al. 1976). Nach dem Göttinger Miniaturschwein ist es das zweitkleinste der Miniaturschweinrassen (Leucht et al. 1982). Für die Fleischproduktion spielt die Rasse keine Rolle.

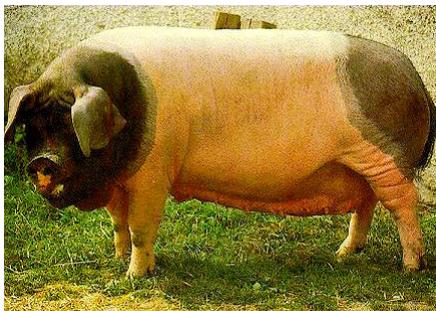
2.5.1.9 Pietrain



(<http://www.pigsonline.org.uk/images/Pietrain%20gilt.JPG>)

Die Pietrain-Schweine stammen ursprünglich aus der Gemeinde Pietrain in Belgien und stammen wahrscheinlich von französischen Bayeux-Schweinen ab, die um 1920 in den Ort gelangten. Die Rasse zeichnet sich durch mageres Fleisch aus, weshalb sie sich ab den 1950er Jahren in ganz Europa durchsetzte. Seit ca. 1970 sind die Pietrain-Schweine die bedeutendste Rasse für die Erzeugung von Hybridzuchtebern in der Mastschweinzucht.

2.5.1.10 Schwäbisch-Hällisch



(www.g-e-h.de/geh-raku/schweine/schwael.htm)

Die Schwäbisch-Hällischen Schweine entstanden um 1820 im Nordosten Baden-Württembergs durch die Kreuzung von chinesischen Maskenschweinen mit einheimischen Rassen. Auch diese alte Haustierrasse verlor Mitte der 1950er Jahre wegen des hohen Fettgehalts ihres Fleisches im Zuge neuer Ernährungsgewohnheiten an Bedeutung und galt Anfang der 80er Jahre schon als ausgestorben. Mitte der 80er Jahre wurde mit sehr wenigen Tieren, die überlebt hatten, eine neue Zucht aufgebaut. Heute werden die Tiere wieder in ca. 1000 kleinen Zuchtbetrieben gehalten und das Fleisch der Tiere wird wegen seiner sehr hohen Qualität geschätzt. Im Unterschied zu der Mastschweinproduktion wird das Fleisch in diesen Betrieben direkt für den Endverbraucher produziert.

2.5.1.11 Wildschwein



(<http://www.tierpark.ch/tiere/pix/wildschwein.jpg>)

Wie eingangs bereits erwähnt stammen alle heutigen Schweinerassen von Wildschweinen ab. Heute kommen Wildschweine in ganz Eurasien sowie Japan und teilweise in Südasiens vor, wobei sich ihr Verbreitungsgebiet im Verlauf der letzten Jahrtausende zum einen aufgrund veränderter Witterungsbedingungen und zum anderen aufgrund menschlicher Eingriffe mehrfach verändert hat. Derzeit sind ca. 20 Unterarten bekannt.

2.5.2 Kohortenzusammensetzung

2.5.2.1 Kontrollkohorte

Als Kontrollkohorte zur initialen Beurteilung der Informativität neu entwickelter Marker dienten jeweils 51 Proben einer Schlachthofkohorte und drei Proben von Meishan-Schweinen, die von der Tierärztlichen Hochschule zur Verfügung gestellt wurden.

Die Proben (Leber) wurden im Verlauf einer Hausschlachtung an einem Nienburger Schlachthof gewonnen. Detaillierte Informationen über die Rassenzugehörigkeit und den Verwandtschaftsgrad der Tiere liegen nicht vor, aber da die Tiere von mindestens 7 unterschiedlichen Höfen stammten und starke Unterschiede im Aussehen aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um mehrere Familien unterschiedlicher Rassezugehörigkeit handelt und die Proben somit geeignet sind, um die Informativität eines neuen Markers beurteilen zu können.

2.5.2.2 Vergleichende Genotypisierung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels vergleichender Genotypisierung den Genpool rezenter Schweinepopulationen an Markerloci für Infektionsresistenz zu bestimmen. Zu diesem Zweck standen die folgenden drei Probensets zur Verfügung:

2.5.2.2.1 Alte / seltene Schweinerassen und Wildschweine

Rasse	Probenanzahl
Angler-Sattelschwein	4
Bunte Bentheimer	2
Europäisches Wildschwein	20
Leicoma	12
Mangalitza	16
Mini-Lewe	4
Schwäbisch-Hällisches Schwein	16

Herkunft der Proben:

Europäisches Wildschwein:

Von den 20 Proben wurden 16 Proben als fertige DNA von Herrn Prof. T. Leeb zur Verfügung gestellt. Die DNA stammt aus den Tonsillen von Bachen bzw. Frischlingen, wobei die genaue Herkunft und der Verwandtschaftsgrad der Tiere unbekannt ist. Die anderen vier Proben stammen von unverwandten Tieren aus dem Raum Nienburg und wurden von Herrn Dr. Lutz Wiehlmann zur Verfügung gestellt.

Leicoma:

Alle 12 Proben stammen von unverwandten Tieren und wurden von der Agrargenossenschaft Ilmtal (Thüringen) über den FBF zur Verfügung gestellt.

Schwäbisch-Hällisches-Schwein:

Alle 16 Proben stammen von unverwandten Tieren und wurden von der Agrargenossenschaft Ilmtal über den FBF zur Verfügung gestellt. Jeweils acht Proben stammen aus dem Bestand des Zuchtbetriebs von Herrn Eberhardt bzw. aus dem Bestand von Herrn Reber.

Bunte Bentheimer

Es handelt sich um privat organisierte Proben einer Sau und eines Ebers (unverwandt) aus dem Betrieb des Landwirts Herrn H. Hellwig aus Hardeggen.

Angler-Sattelschwein:

Es handelt sich um privat organisierte Proben von vier unverwandten Tieren aus dem Betrieb des Landwirts Herrn H. Hellwig aus Hardeggen.

Mini-Lewe:

Die vier Proben der Mini-Lewe Schweine wurden von der Arbeitsgruppe Waldmann der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Über den Verwandtschaftsgrad der Tiere liegen keine Informationen vor.

Mangalitza (Wollschweine):

Die Proben stammen aus fünf unterschiedlichen Wollschwein-Familien und wurden von vier verschiedenen Wollschweinzüchtern privat zur Verfügung gestellt (siehe Anhang).

Die Beprobung einiger Mangalitza-Tiere wurde freundlicherweise von Frau Doris Höltig aus der Arbeitsgruppe Waldmann (Tierärztliche Hochschule Hannover) durchgeführt.

2.5.2.2.2 Verbraucherstudie

Um die Proben für die sogenannte Verbraucherstudie zu beschaffen, wurden deutschlandweit in 30 Städten insgesamt 69 Schweinefleischproben in Supermärkten und Fleischereien eingekauft. Der Großteil der Proben wurde von mir im Verlauf von fünf ganztägigen Zugreisen beschafft. Aus rein pragmatischen Gründen war das Hauptkriterium für den Einkaufsort der Fleischproben hierbei die geographische

Nähe zum jeweiligen Bahnhof, damit mit angemessenem Zeitaufwand möglichst viele Städte in die Studie einbezogen werden konnten. Die Genotypisierung der Proben gibt einen repräsentativen Überblick über den Genpool an den Immunresistenz-Markerloci der derzeitig von den Verbrauchern verzehrten Mastschweinpopulation.

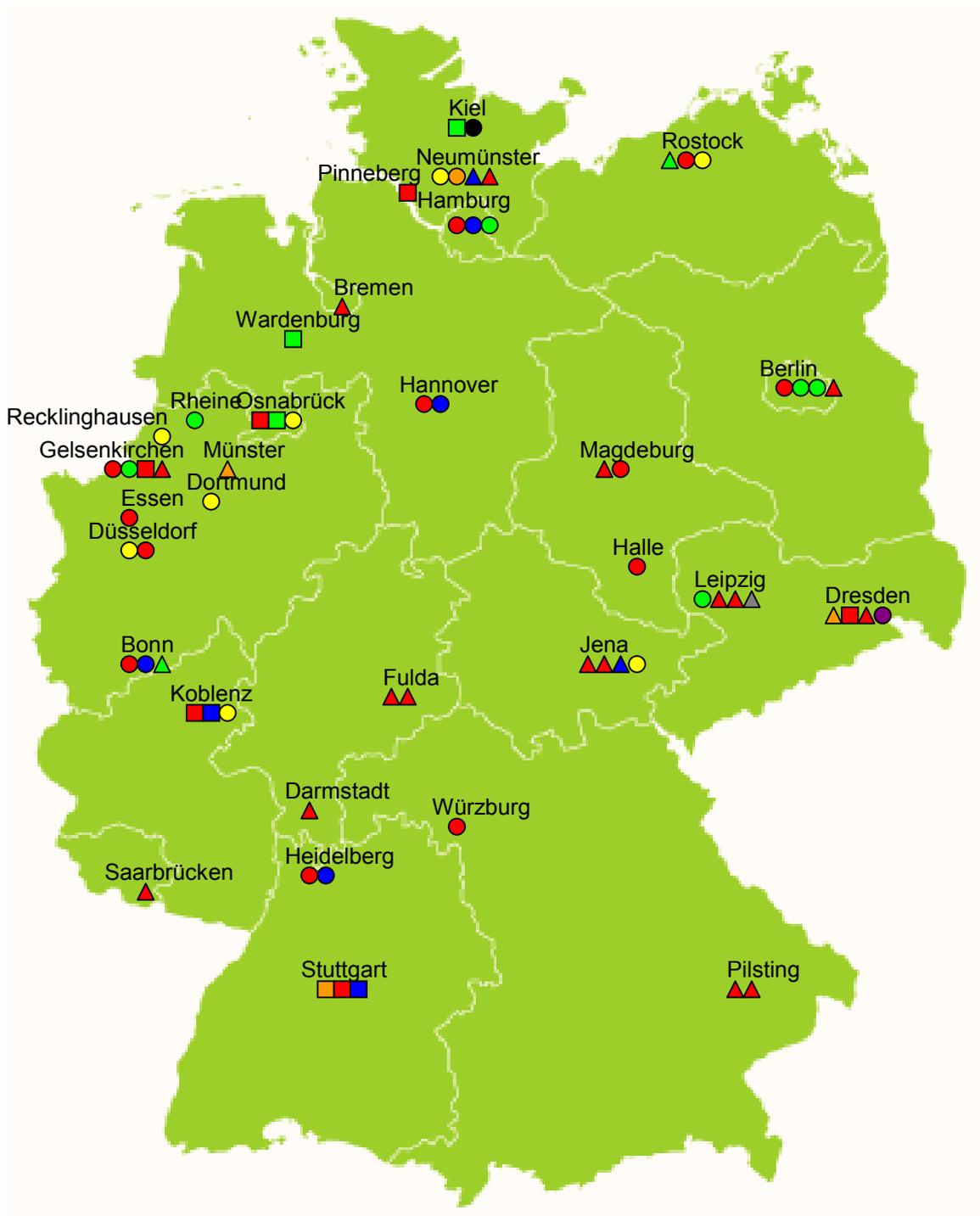


Abbildung 3: Übersicht über die Herkunft der Proben der Verbraucherstudie

Legende:

	Leber	Niere	Bauchfleisch	Minutensteak	Kotelett	Nackensteak	Zunge	Carbnade
Frisch	▲	▲	▲	-	▲	-	▲	-
Frische-theke	■	■	■	-	■	-	-	-
abgepackt	●	●	●	●	●	●	-	●

Jedes Symbol unter einer Stadt steht für ein dort gekauftes Fleischprodukt.
Für detaillierte Informationen zu den Verbraucherstudienproben siehe Tabelle 19 im Anhang .

2.5.2.2.3 Herdlinientiere

Die Züchtungszentrale Deutsches Hybridschwein GmbH (<http://www.bhzp.de/index.php>) führt als staatlich anerkanntes Schweinezuchtunternehmen das Bundeshybridzuchtprogramm durch. Alle zur Zucht verwendeten Tiere sind in sogenannten Herdbüchern eingetragen, in denen die Abstammungsnachweise der Tiere zusammengefasst sind.

Für das IRAS-Projekt wurden freundlicherweise 99 Proben verschiedener Sauen und Eber der Rassen Pietrain, Hampshire, Deutsche Landrasse und von Kreuzungstieren aus Deutsche Landrasse mit Deutschem Edelschwein zur Verfügung gestellt, die derzeit in dem Betrieb zur Mastschweinzucht eingesetzt werden. Aufgrund von patentrechtlichen Auflagen der Projektträger liegen keine Informationen über den Verwandtschaftsgrad der Tiere vor. Aus Zeitgründen konnten für die vorliegende Arbeit bislang nur die folgenden 53 Proben analysiert werden:

Rasse	Anzahl Sauen	Anzahl Eber
Deutsche Landrasse	14	4
Pietrain	11	1
Hampshire	12	2
Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein	4	-
Keine Rasseninformation	1	4

Bis auf acht Proben der Landrassesauen, der Sau ohne Rasseninformation und der Kreuzungstiere sind alle Sauen gleichzeitig auch Mütter der Ferkel aus den im Rahmen von IRAS an der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführten Infektionsversuchen. Ebenso sind alle Eber außer denen ohne Rasseninformation auch Väter der Tiere aus den Infektionsversuchen.

2.5.2.3 Assoziationsstudie

Für den Vergleich der Genotypen an den Resistenzmarkerloci von mild und schwer erkrankten Schweinen nach *A. pleuropneumoniae* Infektion standen aus den an der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführten Infektionsexperimenten insgesamt 100 Proben zur Verfügung. Zusätzlich wurden (falls verfügbar) die zugehörigen Elterntiere genotypisiert. Alle Tiere für die Infektionsversuche wurden von der BHZP zur Verfügung gestellt.

Für die Assoziationsstudie wurden die nachfolgenden Rassen gewählt, da im Verlauf von Infektionsversuchen mit *A. pleuropneumoniae* im Zuge vorangegangener Studien der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Gerlach (Tierärztliche Hochschule Hannover) bereits Unterschiede in der Suszeptibilität dieser Rassen festgestellt werden konnten.

Tabelle 2: Übersicht über alle Proben aus den Infektionsversuchen

Anzahl Familien	Ferkel pro Familie	Eltern verfügbar
Deutsche Landrasse		
1	9	Ja
1	6	Ja
2	3	Ja
7	2	Ja
Pietrain		
9	2	Ja
1	2	Nur Vater
5	1	Ja
3	1	Nur Vater
Hampshire		
9	2	Ja
3	1	Ja
Deutsches Edelschwein		
1	3	Ja
2	2	Nur Vater
9	1	Ja

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolierung hochmolekularer DNA aus Blut oder Gewebeproben

Aus allen unter 2.5.2 angegebenen Proben wurde gemäß Gross-Bellard et al. 1973 DNA isoliert, um sie für die Genotypisierung an den entwickelten Markerloci zu verwenden (siehe 3.1.1).

Die Zusammensetzung aller verwendeter Puffer ist unter 6.1.1 im Anhang aufgeführt. Zunächst wurden 3 – 10 ml K-EDTA Blut bzw. ca. 150 mg Gewebe (frisch oder frisch aufgetaut) in 50 ml Reaktionsgefäßen mit ca. 40 ml Lysis-Puffer für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 3600 rpm für 15 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut mit 25 ml Lysis-Puffer überschichtet, gemischt, für 10 Minuten auf Eis inkubiert, 15 Minuten bei 3600 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Im Falle von Gewebeproben folgte ein dritter Inkubations- / Zentrifugationsschritt mit 15 ml Lysis-Puffer.

Das zuletzt erhaltene Pellet sollte nun ausschließlich die Zellkerne enthalten. Um die an die DNA gebundenen Histone mittels enzymatischem Verdaus zu entfernen, wurde das Pellet mit 4 ml STE Puffer, 400 µl 5% SDS und 50 µl Proteinase-K (50 mg/ml) gemischt und über Nacht bei 56°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

Um die DNA von den Proteinen zu trennen, wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Dafür wurden dem Proteinase-K Verdauansatz jeweils 3 ml Chloroform und 3 ml Isoamylalkohol/Chloroform-Gemisch (1:25) zugesetzt. Nach 10 Minuten Inkubation auf einem Schüttler und anschließender Zentrifugation für 10 Minuten bei 3600 rpm, wurde die untere, organische Phase, die eventuelle Reste von Zelltrümmern, Zuckern und Proteinen enthält, vorsichtig mit einer Glaspasteurpipette entfernt. Dieser Extraktionsschritt wurde im Falle von Blut einmal, im Falle von Gewebe zweimal wiederholt. Die letzte Extraktion erfolgte anschließend mit 6 ml Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch, um Reste von Phenol aus der oberen wässrigen Phase zu entfernen. Zuletzt wurden der die DNA enthaltenden wässrigen Phase 1% des Volumens 3 M Natriumacetat zugegeben, ad 40 ml mit eiskaltem 96%igen Ethanol aufgefüllt und auf Eis inkubiert, um die DNA zu fällen.

Die DNA Fäden wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol überführt und für 5 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Zwischen den Waschschritten erfolgte eine Zentrifugation für 1 Minute. Die Trocknung des Pellets erfolgte für ca. 1 Stunde bei 37°C. Anschließend wurde die DNA in 200 – 700 µl 1 x TE Puffer aufgenommen und für vier Wochen zum Lösen bei 4°C gelagert.

2.6.2 Quantifizierung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem Spektrophotometer 3000 (Hitachi) gemessen. Die Proben wurden nach Bedarf mit Wasser verdünnt und in einer Quarzküvette ein Extinktionsspektrum von 190 bis 320 nm aufgenommen. Als Leerwert diente 1 x TE-Puffer.

$E_{260\text{nm}}$ = Extinktionsmaximum von DNA

$E_{280\text{nm}}$ = Extinktionsmaximum von Proteinen

$E_{320\text{nm}}$ = Leerwert

Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$(E_{260\text{nm}} - E_{320}) \times 50 \times \text{Konzentrationsfaktor} = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g} / \text{ml}]$$

Der spezifische Extinktionskoeffizient von doppelsträngiger DNA ist 50, d.h. eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von ca. 50 µg / ml DNA.

Um eventuelle Verunreinigungen mit Proteinen zu detektieren, wurde zusätzlich der Quotient $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ berechnet.

Dieser sollte für DNA idealerweise bei 2 liegen (Sambrook 1989).

Von allen DNA-Proben wurde anschließend eine Arbeitslösung von 10 ng / µl mit 1 x TE-Puffer hergestellt und bei 4°C gelagert.

2.6.3 PCR basierte Methoden

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine *in vitro*-Technik, bei der ein definierter DNA-Abschnitt enzymatisch vermehrt wird. Voraussetzung hierfür ist, dass dieser Abschnitt von bekannten Nukleotid-Sequenzen flankiert wird, an die zwei synthetische Oligonukleotid-Primer in gegenläufiger Orientierung binden können. Um die Längenpolymorphismen der Mikrosatellitenmotive darzustellen, wird der entsprechende DNA-Abschnitt (PCR) unter Einsatz von biotinylierten Primern amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987).

Die Primersequenzen sollten möglichst selten im untersuchten Genom vorkommen und zur Gewährleistung ihrer Spezifität mindestens 20 bp umfassen (Erich et al. 1992). Alle für diese Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe des „Primer 3“-Programmes des Whitehead Instituts entwickelt (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Für jedes Primerpaar wurden die optimalen Arbeitsbedingungen für die verwendeten Thermozykler durch Variierung der Magnesiumchlorid-Konzentrationen (Co-Faktor für die Polymerase) im Reaktionsansatz, des Mengenverhältnisses beider Primer zueinander und der Annealingtemperatur ermittelt, um eine möglichst hohe Spezifität und Ausbeute der PCR zu gewährleisten.

Jeder Zyklus eines PCR-Programmes besteht aus einem Denaturierungsschritt, bei dem die beiden Stränge der Template-DNA getrennt werden, einem Anlagerungsschritt, bei dem die im Überschuss eingesetzten Primer mit der einzelsträngigen DNA hybridisieren können, und einem Elongationsschritt, bei dem mittels einer DNA-Polymerase ein neuer DNA-Doppelstrang von 5' in 3' Richtung synthetisiert wird. In dieser Arbeit wurde zur Amplifikation rekombinante *Taq*-DNA-Polymerase von Invitak eingesetzt. Der Vorteil der *Taq*-Polymerase liegt in ihrer hohen Hitzebeständigkeit (die Enzym-Halbwertszeit beträgt bei 97,5°C ca. 9 Minuten), allerdings fehlt ihr eine 3'→5' Exonukleaseaktivität, die sogenannte „proof reading“ Funktion, so dass es zu Mutationen auf dem neu synthetisierten DNA-Strang kommen kann (Lawyer et al. 1993).

2.6.3.1 Multiwell-PCR

Während der letzten Jahre wurde in unserem Labor ein standardisiertes PCR-Verfahren erarbeitet, das eine Hochdurchsatz-Genotypisierung von Mikrosatellitenmarkern durch verlässliche Amplifikation der unterschiedlichen Allele ermöglicht. Hierfür werden 96-Loch-Platten und Mehrkanalpipetten verwendet, um möglichst viele Proben gleichzeitig und unter denselben Bedingungen bearbeiten zu können. Alle während dieser Arbeit untersuchten Proben wurden mit Hilfe dieses Verfahrens genotypisiert. Für detaillierte Informationen zu allen verwendeten Primern bzw. untersuchten Mikrosatellitenmotiven siehe 6.4 im Anhang. Die äußeren Reihen wurden nicht zur Probenamplifikation verwendet, sondern mit jeweils 50 µl bidest. Wasser gefüllt, um eine Verdunstung der Reaktionsansätze während der Amplifikation zu verhindern. Zusätzlich wurden alle Reaktionsansätze mit jeweils 15 µl Paraffinöl überschichtet und die Platte mit Hilfe von PCR-Folie versiegelt. Auf diese Weise konnten jeweils 60 Proben gleichzeitig amplifiziert werden.

2.6.3.2 Etablierung der Konditionen für die Hochdurchsatz-Genotypisierung von Mikrosatellitenmotiven

Um bei der Amplifikation neu identifizierter Mikrosatellitenmotive optimale Ergebnisse zu erzielen, wurden die entwickelten Primerpaare zunächst standardmäßig unter 12 verschiedenen PCR-Bedingungen im 96-Well-Plattenformat getestet.

Zwei unterschiedliche Annealingtemperaturen (60°C und 65°C) wurden kombiniert mit jeweils drei unterschiedlichen Magnesiumchloridkonzentrationen (3,3 – 6,6 – 10 mM) und Variation der Primermengenverhältnisse zueinander, d.h. es wurde eine asymmetrische PCR durchgeführt, wobei jeweils ein Primer im 5fach Überschuss in dem Reaktionsansatz vorhanden war. Dies bewirkte, dass nach ca. 20 Zyklen keine logarithmische PCR, sondern eine lineare stattfand, bei der nur noch ein Strang der Ausgangs-DNA amplifiziert wurde. Als Kontrollen dienten fünf DNA-Proben unverwandter Schweine aus der Kontrollkohorte (siehe 2.5.2.1). Die Auswertung der Optimierung erfolgte nach Durchführung einer Direct-Blotting-Gelelektrophorese und anschließender Chemilumineszenzdetektion (siehe 2.8 und 2.9).

Pro Reaktion wurden die PCR-Reagenzien in folgenden Konzentrationen eingesetzt (siehe auch 6.1.5 im Anhang)

Reagenz	Konzentration
F-Primer (biotinyliert)	0,16 μ M oder 0,83 μ M
R-Primer	0,16 μ M oder 0,83 μ M
<u>10 x PCR-Puffer :</u> 500 mM Tris-HCl pH 8,8; 160 mM (NH ₄)SO ₄ ; 0,1% Tween® 20	<u>1 x PCR-Puffer :</u> 50 mM Tris-HCl pH 8,8; 16 mM (NH ₄)SO ₄ ; 0,01% Tween® 20
Magnesiumchlorid	3,3 / 6,6 oder 10 mM*
Taq-Polymerase	0,25 U
DNA	50 ng

*für zwei Marker wurden Magnesiumchloridkonzentrationen von 1,5 bzw. 1,6 mM verwendet

Zur weiteren Verbesserung der Ergebnisse wurde für 8 Marker Betain (0,8 M – 1,2 M) und für vier Marker DMSO (1 : 15 verdünnt) als PCR-Enhancer eingesetzt.

Alle während dieser Arbeit durchgeführten Amplifikationen zur Genotypisierung von Mikrosatellitenmotiven folgten dem in Abbildung 4 gezeigten Verlaufsschema. Lediglich die Annealingtemperatur wurde variiert.

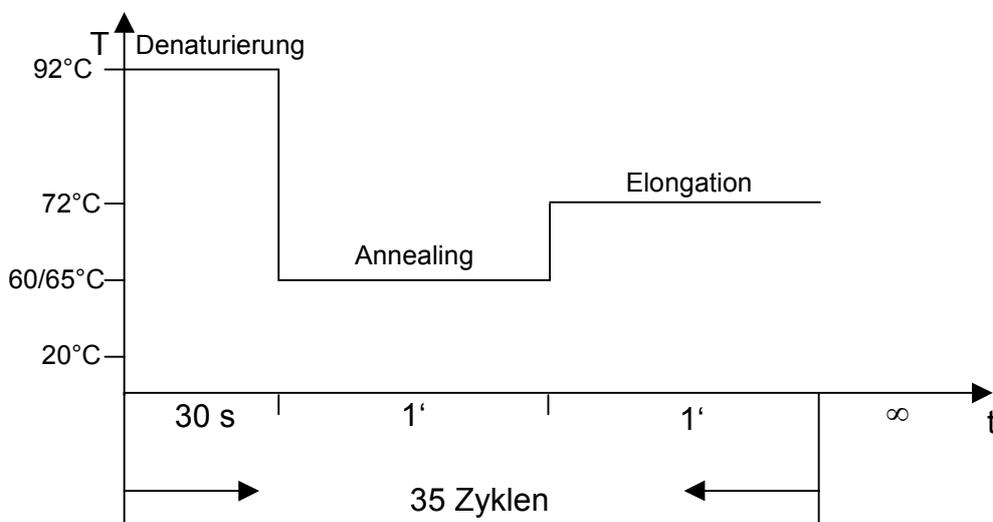


Abbildung 4: PCR-Verlaufsschema

Vor Beginn des eigentlichen Programms wurde die Deckelheizung des Thermozyklers auf 95°C und der Thermoblock auf 50°C vorgeheizt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt für 3 Minuten folgten 35 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung bei 92°C, 1 Minute Annealing bei der für das jeweilige Primerpaar optimalen Temperatur und ein einminütiger Elongationsschritt bei 72°C. Nach Vollendung der Zyklen folgte ein finaler Elongationsschritt für 3 Minuten und anschließende Abkühlung auf 20°C.

2.6.3.3 Vorgehen zur Überprüfung der DNA-Qualität

Um die Qualität der isolierten, hochmolekularen DNA zu überprüfen, wurde für alle Proben eine symmetrische PCR im 96-Well Format mit dem unter 2.6.3.2 angegebenen Reaktionsverlauf durchgeführt. Zur Amplifikation wurde ein Primerpaar verwendet, für das zuvor die optimalen Arbeitsbedingungen ermittelt wurden, d.h. mit anderen DNA-Proben konnte bereits ein sauberes PCR-Produkt nachgewiesen werden. Das verwendete Primerpaar amplifiziert ein 175 bp großes Produkt und arbeitet optimal bei einer Annealingtemperatur von 65°C und mit einer Magnesiumchloridkonzentration von 1,6 mM.

Pro Reaktion wurden die PCR-Reagenzien in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Reagenz	Konzentration
F-Primer (biotinyliert)	0,5 µM
R-Primer	0,5 µM
<u>10 x PCR-Puffer :</u> 500 mM Tris-HCl pH 8,8; 160 mM (NH ₄)SO ₄ ; 0,1% Tween® 20	<u>1 x PCR-Puffer :</u> 50 mM Tris-HCl pH 8,8; 16 mM (NH ₄)SO ₄ ; 0,01% Tween® 20
Magnesiumchlorid	1,6 mM
Taq-Polymerase	0,4 U
DNA	50 ng

2.6.3.4 GenomiPhi-Amplifikation

Das GenomiPhi-Amplifikationskit von GE Healthcare ermöglicht die Amplifikation ganzer Genome mit Hilfe Phi29 DNA Polymerase aus Bakteriophagen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Kit verwendet, um die DNA Menge von Proben, bei denen die DNA Isolierung nur eine geringe Ausbeute brachte, zu erhöhen, bzw. DNA Ressourcen zu erneuern, von denen keine weiteren Blut oder Gewebeproben zur Verfügung standen.

Gemäß der Modifikationen von Frau Silke Hedtfeld wurden jeweils 1 µl der zu amplifizierenden DNA Probe mit 9 µl Probenpuffer, der „Random-Primer“-Hexamere enthält, gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 9 µl Reaktionspuffer, der u.a. die dNTPs enthält, und 1 µl Polymerase zugefügt. Der gesamte Reaktionsmix wurde für 22 Stunden bei 30°C

inkubiert, anschließend für 10 Minuten auf 65°C erhitzt und am Ende auf 10°C gekühlt.

Zur Überprüfung des Amplifikationsergebnisses wurde wie unter 2.7 beschrieben eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt und die Proben anschließend jeweils zunächst mit 50 µl 1x TE-Puffer verdünnt.

Anschließend wurde die DNA Qualität mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese überprüft, wobei jeweils 5 µl einer 1:2,5 und einer 1:10 Verdünnung des bereits vorverdünnten GenomiPhi-Produktes in die PCR eingesetzt wurde, um zu überprüfen, bei welcher Konzentration noch ein Produkt nachweisbar ist.

Entsprechend der Ergebnisse wurde das gesamte GenomiPhi-Produkt nun mit 1X TE-Puffer verdünnt und konnte für die Hochdurchsatz-Typisierung der Mikrosatellitenmarker verwendet werden (5 µl pro Reaktion).

2.7 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die negativ geladene DNA bewegt sich dabei von der Kathode zur Anode, wobei ihre Beweglichkeit weitgehend von der Molekülgröße abhängt. Während dieser Arbeit wurde die Agarosegelelektrophorese ausschließlich zu analytischen Zwecken verwendet, um zum einen die Qualität der isolierten, hochmolekularen DNA-Proben zu beurteilen und zum anderen die Genomi-Phi-Amplifikationen zu überprüfen. Dazu wurden Gele mit einer Konzentration von 1% Agarose zur Überprüfung der Genomi-Phi-Amplifikationen bzw. 2% Agarose zur Überprüfung der DNA Qualität verwendet. Die Agarose wurde in einem Erlenmeyerkolben abgewogen, zusammen mit 1xTBE bei 200°C auf einem Heizrührer aufgekocht und anschließend in einen Gelschlitten mit eingesetzten Kämmen gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 1x TBE-Puffer übergossen. Für die Elektrophorese wurden die PCR-Produkte zur Überprüfung der DNA Qualität ca. 1:1 mit Probenpuffer versetzt und die Produkte der GenomiPhi-Amplifikation ca. 1:10 mit Probenpuffer verdünnt und mit Hilfe einer Mehrkanalpipette aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte bei 120 V für ca. 5 Stunden (GenomiPhi) bzw. bei 150 V für ca. 60 Minuten (DNA Überprüfung) und wurde in einem Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde das Gel im Ethidiumbromidbad (ca. 30 µl einer 0,2%igen Stammlösung auf 500 ml Wasser) für ca. 30 Minuten gefärbt und danach zweimal für ca. 10 Minuten im Wasserbad entfärbt. Der Nachweis der DNA-Banden bzw. im Falle der GenomiPhi-Amplifikationsprodukte des für hochmolekulare DNA typischen Musters gescherter DNA, konnte nun unter UV-Licht bei 302 nm erfolgen, das das Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregt. Zur Dokumentation wurden Fotografien der fluoreszierenden DNA-Banden angefertigt.

2.8 Direct Blotting

Die Analyse der Mikrosatellitenmarker erfolgte durch die Direct-Blotting-Gelelektrophorese-Technik gemäß Beck et al. (1984) und Mekus et al. (1995).

Bei dieser Technik wird ein denaturierendes Polyacrylamidgel und eine „High-Voltage“-Gelelektrophorese (1900 V) eingesetzt, um kleine DNA-Fragmente hochauflösend zu trennen. Die während dieser Arbeit aufgetrennten Produkte hatten eine Größe von ca. 150 – 210 bp. Am Ende des vertikalen Gels wurden die negativ geladenen Produkte auf eine positiv geladene Nylonmembran „geblottet“, die mittels eines Förderbandes unter dem Gel entlang transportiert wurde. Um eine optimale Trennung der einzelnen Allele zu erzielen, wurde die Laufgeschwindigkeit des Förderbandes individuell für jeden Marker ermittelt. Diese Methode ist geeignet für Hochdurchsatz-Genotypisierungen, da auf ein Gel nacheinander mehrere Probenläufe mit jeweils 32 Proben aufgetragen werden konnten.

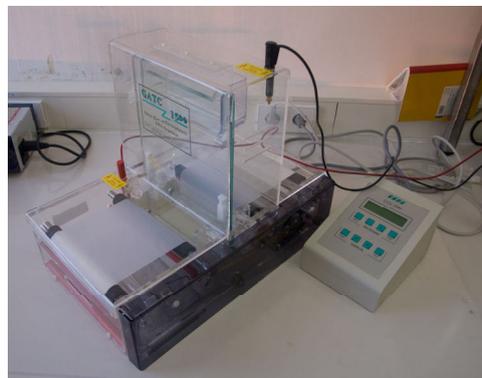
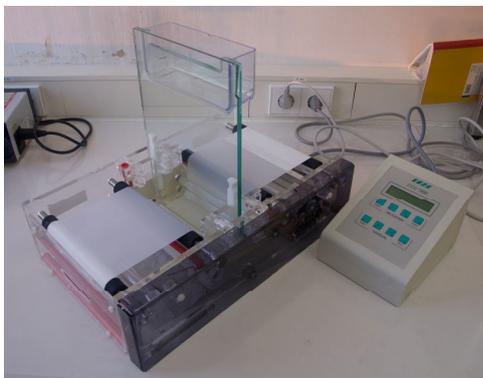


Abbildung 5: Darstellung der Direct-Blotting-Apparatur

2.8.1 Gelpreparation

Das Gel wurde gemäß den Angaben des Herstellers vorbereitet. Für die Mikrosatellitenanalyse wurde ein 4% Polyacrylamidgel (Acrylamid/ Bisacrylamid 37,5 : 1) mit 8,3 M Harnstoff in 1x TBE-Puffer mit einer Dicke von 0,19 cm verwendet. Nach der Polymerisation und dem Einbau in die Elektrophoresevorrichtung wurde zunächst zur Equilibration des Gels eine Elektrophorese mit 1500 V für 30' durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit 1900 V für eine Stunde auf eine Temperatur von ca. 50°C gebracht, bevor die Proben aufgetragen wurden. Der 1x TBE-Puffer für die untere Pufferkammer wurde vor der Benutzung für ca. eine Stunde unter Vakuum entgast.

2.8.2 Probenvorbereitung

Für die standardisierte Hochdurchsatz-Genotypisierung der Mikrosatellitenmarker unter optimalen PCR-Bedingungen wurden 96-Well Platten pro Well mit 5 µl DNA-Arbeitslösung (10 ng/µl) bestückt und bis zum vollständigen Trocknen bei 4°C gelagert. Vor Durchführung einer PCR gemäß 2.6.3.1 wurden die Proben in jeweils 5 µl bidest. Wasser gelöst. Die Erfahrungen in unserem Labor haben gezeigt, dass auch über mehrere Jahre gelagerte Platten noch reproduzierbare Ergebnisse liefern. Anschließend wurden jeweils 5 – 8 µl des PCR-Produktes in PCR-Einzelketten-Gefäße überführt, für zwei Tage bei 37°C getrocknet und anschließend mit 5 – 9 µl Formamid-Probenpuffer (siehe 6.1.3) versetzt, der als Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol enthielt. Die jeweils eingesetzten Volumina hingen ab von dem getesteten Motiv und wurde individuell variiert. Die Farbstoffe dienten zum einen als Orientierungshilfe beim Probenauftrag und zum anderen als Größenstandard in einem 4 % Polyacrylamidgel (Acrylamid/ Bisacrylamid 37,5 : 1). Bromphenolblau läuft ungefähr auf derselben Höhe wie ein 120 bp großes Produkt und Xylencyanol auf der Höhe eines 200 bp Produktes. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend bei –20°C schock-gekühlt. Das Auftragsvolumen betrug jeweils 1,5 µl. Für jeden Marker wurde individuell aus den fünf für die Optimierung verwendeten DNA-Proben Kontrollen ausgewählt, die bei jedem Lauf mitgeführt wurden. Sie dienten als Orientierungshilfe für die Längenkalibrierung der Allele aller nachfolgend untersuchten Proben. Pro Gel

wurden im Regelfall vier Läufe aufgetragen, was der Analyse von zwei kompletten 96-Well-Platten entspricht.

2.8.3 Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde bei 1900 V durchgeführt, nachdem die Proben 1-2 Minuten bei 500 V in das Gel eingelaufen waren. Im Falle der Analyse einer Optimierungs-PCR wurden die Läufe im Abstand von 65 Minuten aufgetragen, um zu gewährleisten, dass sich die Proben nicht überschneiden. Zum Blotting wurde eine 30 cm lange Membran für jeweils zwei Läufe verwendet. Sobald der erste Bromphenol-Marker auf die Membran auftraf, wurde diese gestartet. Aus Vorerfahrungen wurde eine Transportgeschwindigkeit von 20 cm/h bei Dinukleotid-Repeatmotiven und 17 cm/h bei allen Motiven mit längeren Repeats gewählt, um eine scharfe Trennung der Allele zu bekommen. Nach Auswertung der Optimierungsläufe konnte für jeden Marker exakt errechnet werden, nach welcher Zeit die Proben auf die Membran treffen. Im Falle von Markern, bei denen im Verlauf der PCR keine Nebenprodukte gebildet werden bzw. die Allele keine weite Streuung aufweisen, konnten die folgenden Läufe der PCR-Produkte für jeden Marker verschachtelt aufgetragen werden. Diese Verschachtelungstechnik brachte eine enorme Zeitersparnis bei der nachfolgenden standardisierten Genotypisierung aller Proben für jeden Marker. Im besten Fall konnte die benötigte Arbeitszeit für vier Läufe (Durchschnitt pro Gel) um die Hälfte reduziert werden. Außerdem wurde weniger Membranmaterial verbraucht, so dass außerdem die Kosten für die Analysen gesenkt wurden.

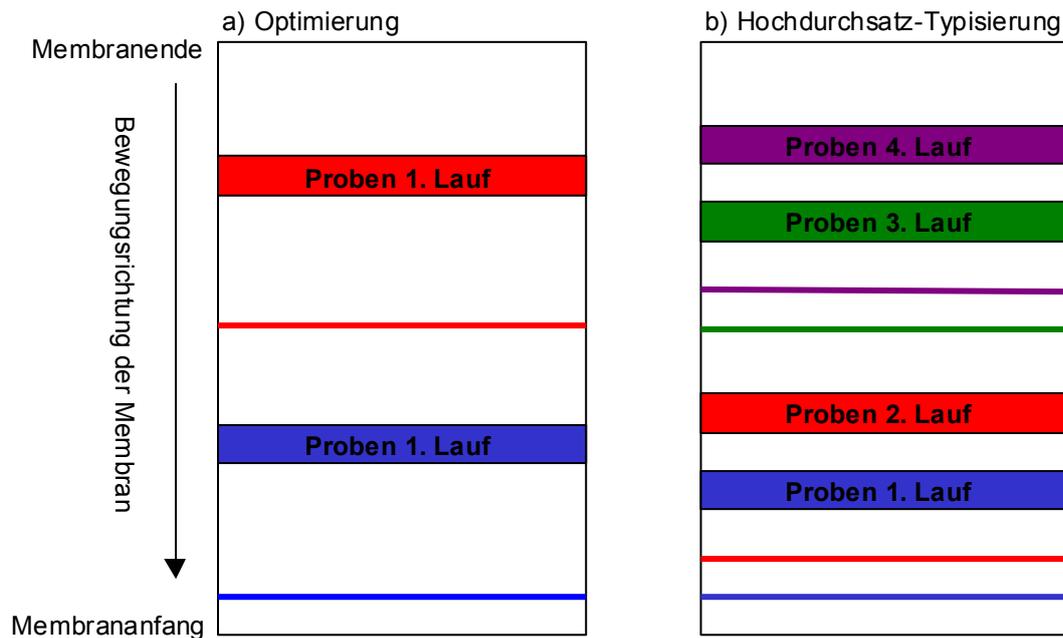


Abbildung 6: Schematische Veranschaulichung der Zeitersparnis bei verschachtelter Auftragstechnik

Anhand von Abbildung 6 soll die Zeitersparnis verdeutlicht werden, die durch eine verschachtelte Auftragstechnik bei der Hochdurchsatz-Typisierung im Vergleich zu den Optimierungsläufen erreicht werden kann. Eine Farbe markiert jeweils den auf die Membran getroffenen Bromphenolblau-Marker (Linie) eines Laufes und die dazugehörigen Proben. Abbildung a) zeigt das Schema einer Membran mit zwei aufgetragenen Optimierungsläufen eines Markers und Abbildung b) die anschließende standardisierte Hochdurchsatz-Typisierung desselben Markers mit verschachtelter Auftragstechnik. Wie bei dem Vergleich der beiden Abbildungen zu erkennen ist, können im Vergleich zur Optimierung mit der Verschachtelungstechnik doppelt so viele Läufe auf dieselbe Membranlänge geblottet werden. Dies ist möglich, da nach den Optimierungsläufen genau berechnet werden kann, in welchem Zeitraum nach dem Auftreffen des Bromphenolblau-Markers eines Laufes die Proben auf die Membran treffen.

2.9 CDP-Chemilumineszenzdetektion

Die biotinylierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe der von Chemilumineszenz detektiert. Die Zusammensetzungen aller verwendeter Reagenzien sind unter 6.1.4 aufgeführt. Die Membranen wurden zunächst für 30 Minuten mit Blocking-Reagenz-Gebrauchslösung unter Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindestellen mit Proteinen abzudecken. Anschließend erfolgte eine 1–2 stündige Inkubation unter Schütteln mit einem Anti-Biotin-Antikörper mit alkalische Phosphatase-Aktivität. Dafür wurde der Antikörper ca. 1:35 in Blocking-Reagenzlösung verdünnt, wobei ca. 225 ml dieser Lösung ausreichend waren für eine Inkubation von zwei 15 x 30 cm langen

Membranen. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, folgten drei jeweils 10 minütige Waschschriffe mit je ca. 300 ml Waschpuffer. Als Waschpuffer diente 1x P1-Puffer, dem 1% TRITON-X zugesetzt wurde. Nach dem Waschen wurden die Membranen in 1x P3-Puffer für mindestens fünf Minuten umgepuffert. Um während des Autoklavierens ausgefallenes Magnesiumoxid (MgO) aus dem Puffer zu entfernen, wurde er vor der Benutzung filtriert. Nach dem Umpuffern wurde die eigentliche Chemilumineszenzreaktion induziert. Dazu wurden die Membranen für fünf Minuten unter Schwenken mit der zuvor vorbereiteten konzentrierten CDP-Star-Lösung inkubiert. Überschüssiges CDP-Star wurde darauf durch kurzes Spülen mit der verdünnten CDP-Star-Lösung entfernt. Das CDP-Star dient während der Reaktion als Substrat für die alkalische Phosphatase. Das Enzym spaltet CDP-Star und dadurch wird Licht (Chemilumineszenz) freigesetzt. Zur Kostenreduzierung wurden die CDP-Star-Lösungen mehrfach verwendet und zwischen den Anwendungen bei -20°C gelagert. Um die Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen sichtbar zu machen, wurden die Membranen luftblasenfrei in Schlauchfolie eingeschlagen und in einer Röntgenkassette befestigt. Die Exposition der Röntgenfilme auf den Membranen und die anschließende Entwicklung erfolgte in einer Dunkelkammer. Die Expositionszeit variierte von 1 s bis zu einer Stunde war u.a. abhängig vom Alter der CDP-Star-Lösungen und der Effizienz der PCR. Desweiteren wurden für jeden Film Expositionsreihen angefertigt, um die verschiedenen Allele heterozygoter Genotypen diskriminieren und tatsächliche Allele von Nebenprodukten unterscheiden zu können.

2.9.1 Auswertung der Röntgenfilme

Die Auswertung der Bandenmuster bzw. die Größenkalibrierung der verschiedenen Allele der entwickelten Marker erfolgte ausschließlich manuell. Das kleinste in der Kontrollkohorte auftretende Allel wurde mit „10“ benannt, unabhängig von der tatsächlichen Anzahl der Repeateinheiten. Die Benennung wurde mit „10“ begonnen, damit im Falle des Vorkommens von kleineren Allelen in anderen Kohorten keine negativen Zahlen benutzt werden müssen. Mit Hilfe von selbst angefertigten Skalen für jeden Marker erfolgte die weitere Benennung aller übrigen Allele in den verschiedenen Kohorten, wobei z.B. eine Benennung mit „11“ bedeutet, dass das Allel um eine Repeateinheit größer ist als das 10er Allel usw.. Da die Spreizung der verschiedenen Allele eines Markers bei jeder Elektrophorese geringfügig variieren kann, wurden bei jedem Lauf Proben mit bereits bekanntem Genotyp aus der Kontrollkohorte mitgeführt, anhand derer die Größenkalibrierung der Allele in der neuen Kohorte erfolgte.

Beispiele für die Interpretation der Bandenmuster zweier Marker anhand von Genotypen von Familien aus den Infektionsversuchen:

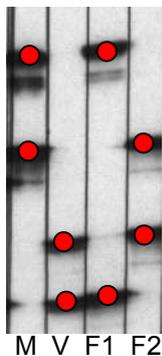


Abbildung 7: Tetranukleotid-Marker visualisiert auf Röntgenfilm

M: Mutter; V: Vater; F1: Ferkel1; F2: Ferkel2

Die roten Punkte markieren jeweils die Hauptallele der Proben.

Die verschiedenen Allele dieses Markers sind einfach zu diskriminieren. Alle vier Individuen der Familie tragen heterozygote Genotypen. Wegen der Mendelschen Vererbungsregeln konnten die unteren, schwächeren Banden, die hier besonders deutlich bei beiden Allelen der Mutter und bei dem oberen Allel des Ferkel1 auftraten, als Nebenprodukte identifiziert werden. Das kleine Allel des Vaters und des ersten Ferkels unterscheiden sich um 8 Repeateinheiten von dem größten Allel innerhalb dieser Familie.

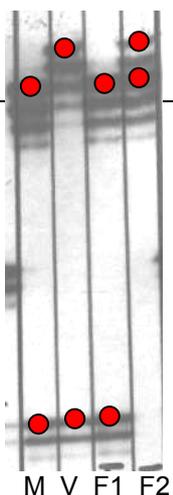


Abbildung 8: Dinukleotid-Marker visualisiert auf Röntgenfilm

M: Mutter; V: Vater; F1: Ferkel1; F2: Ferkel2

Die roten Punkte markieren jeweils die Hauptallele der Proben.

Die Benennung der jeweiligen Hauptallele dieses Markers ist deutlich schwerer. Aber durch den Vergleich der Bandenmuster eindeutig heterozygoter Individuen mit potentiell homozygoten Genotypen und mit Hilfe von Familienanalysen ist eine eindeutige Benennung der jeweiligen Hauptallele möglich. Außerdem können Filme einer Expositionsreihe herangezogen werden, um zwischen Hauptallele und Nebenprodukten eindeutig unterscheiden zu können. Mit Hilfe dieser Methoden konnte schließlich das folgende Lesemuster für diesen Marker entwickelt werden: Alle Individuen dieser Familie tragen heterozygote Genotypen. Das kleine untere Allel erscheint immer mit einer etwa gleichstarken und einer schwachen dritten Nebenbande, während die größeren Allele aller Individuen mit jeweils zwei starken und einer schwachen Nebenbande erscheinen. Die Größe der Allele dieser Familie variiert um 21 Repeateinheiten.

Generell war die Interpretation der Bandenmuster von Dinukleotidrepeatmotiven aufgrund vermehrten Auftretens von Nebenbanden schwieriger als die Auswertung von Markern mit höherer Repeatgrundzahl wie Tri- und Tetranukleotidmotiven und erforderte ein hohes Maß an Übung und Erfahrung.

Erschwerend kam hinzu, dass die Tierkohorten für die vergleichende Genotypisierung im Gegensatz zu der Kohorte für die Assoziationsstudie nicht aus Familien bestanden, d.h. für diese Proben konnte bei unklarem Bandenmuster nicht auf Genotypen aufgrund der Mendelschen Vererbungsgesetze rückgeschlossen werden.

2.10 Statistische Analysen

2.10.1 PIC-Wert

Zur initialen Beurteilung der Güte eines Markers wurde zunächst sein Informationsgehalt bestimmt aufgrund seiner Allelverteilung in der Kontrollkohorte. Der Informationsgehalt hängt von der Anzahl der gefundenen Allele und ihrer Frequenz in den Probensets bzw. der Bevölkerung ab. Als Maß für die Beurteilung der Informativität der für diese Arbeit verwendeten Marker diente der Polymorphismus-Informationsgehalt (PIC), der 1980 von Botstein et al. wie folgt definiert wurde:

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

n = Anzahl der beobachteten Allele

$p_i p_j$ = relative Häufigkeit des i -ten und j -ten Allels am betrachteten Locus

Der PIC-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass aus dem Markergenotypen eines Nachkommen abgeleitet werden kann, von welchem Elternteil welches Allel stammt. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei 1 hochinformativ bedeutet und 0 nicht informativ.

2.10.2 Heterozygotieindex

Mit Hilfe des Heterozygotieindexes wurde in der vorliegenden Arbeit der Verwandtschaftsgrad der Elterntiere zu den Ferkeln aus den Infektionsversuchen beurteilt (siehe 3.5.2.3). Der Heterozygotieindex H gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Individuum an dem betrachteten Markerlocus heterozygot ist, d.h. H entspricht dem erwarteten prozentualen Anteil an heterozygoten Individuen in der betrachteten Population.

Der Heterozygotieindex an den Markerloci für die Verbraucherstudienkohorte wurde als Sollwert für das Verhältnis heterozygoter zu homozygoter Individuen in den Elterntieren jeder Rasse angenommen. Dass es sich bei der Verbraucherstudienkohorte tatsächlich um eine Outbred-Population handelt, die als Referenzkohorte geeignet ist, wurde zuvor belegt (siehe 3.3.1).

Der Heterozygotieindex berechnet sich nach folgender Formel:

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

p_i : Frequenz des i -ten Allels in der betrachteten Population

$\sum p_i^2$: Die Summe der quadrierten Allelfrequenzen aller auftretenden Allele in der Population; entspricht dem erwarteten prozentualen Anteil an homozygoten Individuen

Die Anzahl real beobachteter hetero- bzw. homozygoter Tiere in den Elterntierkohorten wurden für jeden Markerlocus anschließend mit den auf Basis des Heterozygotieindexes in der Verbraucherstudie berechneten Sollwerten verglichen. Dazu wurde die im folgenden beschriebene Clump-Software verwendet.

2.10.3 Monte Carlo Simulation mit Hilfe der CLUMP-Software

Das Programm Clump (Sham und Curtis 1995) beschreibt die Unterschiedlichkeit zweier zu vergleichender Allelverteilungen mit Hilfe von Monte Carlo simulierten

Tabellen gleicher Stichprobengröße und Allelverteilung wie in der realen Stichprobe beobachtet. Ein Marker mit N Allelen erzeugt dabei eine N x 2 Tabelle (N Spalten; zwei Zeilen). Auf Basis dieser Tabelle werden z.B. 100.000 Tabellen simuliert. Für den realen Datensatz und die simulierten Tabellen wird die Prüfgröße χ^2 ermittelt. Clump vergleicht, wie häufig unter den simulierten Tabellen eine ebenso seltene oder noch seltenere Verteilung auftritt, d.h. wie häufig die simulierten Tabellen einen χ^2 Wert ergeben, der genauso groß oder größer als der Wert für den realen Datensatz ist.

Der p-Wert wird anschließend wie folgt abgeleitet:

Sind von 100.000 Monte Carlo simulierten Verteilungen 5000 ebenso unwahrscheinlich oder unwahrscheinlicher als der reale Datensatz, ergibt sich

$$p = 100.000 / 5000 = 0,05$$

Für die während dieser Arbeit durchgeführten Vergleiche ist keine Ermittlung eines χ^2 –Wertes ohne Monte Carlo Simulation erlaubt, da mindestens fünf oder mehr Beobachtungen pro Zelle vorhanden sein müssten. Geringe Beobachtungszahlen können aber in diesem Fall ein biologisch wichtiges Signal sein, z.B. ist denkbar, dass letale Allele in einigen Probenkohorten fehlen.

Das Programm wendet vier verschiedene Algorithmen (T1-T4) an, bei denen jeweils andere Spalten (1 Spalte = Beobachtungszahlen eines Allels in zwei Kohorten) bzw. Spaltenkombinationen in die Berechnung einbezogen werden, um den höchsten χ^2 -Wert zu ermitteln, so dass am Ende vier verschiedene p-Werte für einen Vergleich vorlagen:

T1: Die χ^2 -Wert Berechnungen werden mit der gesamten ursprünglichen N x 2 Tabelle durchgeführt.

T2: Für die χ^2 -Wert Berechnungen werden die Spalten mit kleinen Beobachtungszahlen summiert, bis mindestens eine Beobachtungszahl von fünf erreicht wird, und anschließend wird die Berechnung des χ^2 -Wertes mit der dadurch reduzierten Spaltenanzahl durchgeführt.

T3: Für die Berechnung des χ^2 -Werts wird jeweils eine Spalte mit der Summe aller anderen verglichen (2 x 2 Tabelle) und der beste Wert als Output angegeben.

T4: Für die χ^2 -Wert Berechnungen werden jeweils n Spalten summiert und mit $n = 1$ bis (Gesamtzahl der Zeilen – 1), also allen Möglichkeiten, eine 2 x 2 Tabelle abzuleiten, verglichen. Der beste Wert wird als Output angegeben.

Ergeben sich signifikante p-Werte aus T1 und/oder T4, kann auf eine generell unterschiedliche Allelverteilung zwischen den beiden Gruppen geschlossen werden, während signifikante p-Werte aus T2 und/oder T3 auf eine andere Verteilung eines einzelnen Allels schließen lassen.

Sham & Curtis haben anhand eines realen Datensatzes zeigen können, dass p-Werte aus T1 und T4 generell die höchsten Signifikanzlevels haben.

Für die vorliegende Arbeit wurden die p-Werte aus T1 zur Beurteilung der Signifikanz herangezogen.

2.10.4 Rangtest nach Mann-Whitney

In der vorliegenden Arbeit wurde der Rangtest nach Mann-Whitney angewandt, um zu überprüfen, ob es Rasseunterschiede hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung zwischen den für die Infektionsversuche verwendeten vier Rassen gibt (siehe 3.4.1.2). Der Test wird generell angewandt für den Vergleich jeweils zweier Stichproben bestehend aus ordinalen Daten. In dieser Arbeit handelt es sich bei den verwendeten Datensätzen um die jeweiligen Rangzahlen der nach Schweregrad der Erkrankung in eine Rangreihe sortierten Familien der Tiere aus den Infektionsversuchen. Die Nullhypothese ist bei jedem Vergleich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Rassen gibt.

Die Prüfgrößen U_1 und U_2 berechnen sich nach folgenden Formeln:

$$U_1 = n_1 \times n_2 + 0,5 \times n_1 \times (n_1 + 1) - R_1$$

$$U_2 = n_1 \times n_2 + 0,5 \times n_2 \times (n_2 + 1) - R_2$$

n_1 = Anzahl der untersuchten Familien der Rasse 1

n_2 = Anzahl der untersuchten Familien der Rasse 2

R_1 = Summe der Rangzahlen der Rasse 1

R_2 = Summe der Rangzahlen der Rasse 2

Da U_1 und U_2 bei gegebenen Stichprobengrößen immer dieselbe Summe ergeben ($U_1 + U_2 = n_1 \times n_2$), ist es ausreichend, nur einen der beiden U-Werte als Prüfgröße zu verwenden. Standardmäßig wird der kleinere der beiden Werte verwendet:

$$U = U_{\min}(U_1; U_2)$$

Als nächstes wird der kritische Wert U^* mit folgenden Eigenschaften bestimmt:

Ist $U \leq U^*$ so wird die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit α verworfen, d.h. es gibt signifikante Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen.

Ist $U > U^*$ so wird die Nullhypothese nicht verworfen.

Der kritische Wert U^* ist in Abhängigkeit von α und den Stichprobenumfängen n_1 und n_2 ist in entsprechenden Tabellen abzulesen (Lorenz und Vollmar 1996).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Mikrosatellitenentwicklung

3.1.1 Sequenz-Identifizierung zu Kandidatengen und Markeretablierung

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick darüber, woher die Sequenzen der 48 Kandidatengene stammten, innerhalb derer Mikrosatellitenmotive für die Markerentwicklung identifiziert wurden, und wieviele Motive für jedes Kandidatengen getestet werden mussten, um einen informativen Marker etablieren zu können. Außerdem ist der Informationsgehalt der entwickelten Marker in Form des PIC-Wertes angegeben. Für jedes Motiv wurden zunächst Primerpaare entwickelt und diese dem wie unter 2.6.3 beschriebenen Optimierungsprozess unterzogen. Falls das Mikrosatellitenmotiv nach der Optimierung vielversprechend aussah, d.h. innerhalb der fünf Kontrollproben wurden mindestens drei verschiedene, gut unterscheidbare Allele identifiziert, so wurden anschließend die Proben der Kontrollkohorte genotypisiert und anhand der Allelverteilung der PIC-Wert für den Marker errechnet.

Tabelle 3: Übersicht über alle etablierten Marker

Kandidatengen(e)	Sequenz-Quelle	n Motive getestet	Als Marker etabliert	PIC-Wert(e)
TNFRSF1A / TNFRSF7 ¹	NCBI: NM_213969; UniSTS 253493 (Ssc. mRNA)	1	MS 1	0,51
Tyk2	NCBI: AJ632303 (Ssc. Genom. Seq.)	5	MS 2	0,39
			MS 4	0,35
CD14	RP44-380D12	7	MS 1	0,28
			MS 10	0,80
CD95	RP44-358L10	7	MS 5	0,85
			MS 7	0,54
BPI	CH242-237C2	8	MS 2	0,38
			MS 3	0,49
			MS 6	0,28
Transferrin	CH242-119H19	2	MS 1	0,79
Transferrinrezeptor 1	PigE-98B8	6	MS 9	0,36
Transferrinrezeptor 2	CH242-46P3	4	MS 1	0,82
pBD-1	PigE-101N6	6	MS 4	0,26
PR-39	PigE-71F2	7	MS 1	0,77
PG-1	Keine Sequenz verfügbar	-	-	-

Kandidatengen(e)	Sequenz-Quelle ³	n Motive getestet	Als Marker etabliert	PIC-Wert(e)
TLR1 / 6 / 10 ¹	NCBI: AB210286 (Ssc. Genom. Seq.)	4	MS 1	0,40
			MS 3	0,79
TLR2	NCBI: 208696 (Ssc. genom. Seq.) und CH242-452124*	8	MS 1	0,11
			MS 5	0,38
TLR3	Pigl-249G7	2	MS 1	0,74
TLR4	CH242-2F11 (Seq. in NCBI)	2	MS 1	0,78
TLR5	Keine Sequenz verfügbar	-	-	-
TLR7 / TLR8 ¹	CH242-433O23	2	MS 2	0,76
TLR9	CH242-478N14	4	MS 1	0,69
SARM1	CH242-279P12	6	-	-
TNFRSF1B / 8 ¹	RP44-337G9*	3	MS 1	0,49
IFNGR1	RP44-353N17*	2	MS 3	0,73
IFNAR1 / IFNGR2 ¹	RP44-362L19**	4	MS 2	0,72
			MS 4	0,37
IL12RB1	Keine Sequenz verfügbar	-	-	-
CXCR2 (=IL8R1)	NCBI: BES CT139166 (PigE-184C7)	1	MS 1	0,59
IL12Rb2 / IL23R ¹	CH242-314C21	4	MS 1	0,58
			MS3b	0,65
IL18R1	Pigl-433D11	2	MS 6	0,51
TNFRSF4 / 18 ¹	CH242-106L15	5	-	-
CD40	RP44-358P12*	2	MS 3	0,74
TNFRSF6B	Keine Sequenz verfügbar	-	-	-
TNFRSF9	CH242-385M24	5	-	-
TNFRSF10A/B/C/D ¹	CH242-419I17	8	-	-
TNFRSF11A	CH242-271I4	5	-	-
TNFRSF11B	RP44-414I18*	2	MS 3	0,66
TNFRSF12A	CH242-307D17	2	MS 6n	0,55
TNF α/β ^{1,2}	NCBI: X54859 (Ssc. genom. Seq.)	1	MS 1	0,81
NRAMP1 ²	NCBI: M94994 (Ssc. repeat S008)	1	MS 1	0,36

Der Spalte „Sequenz-Quelle“ kann entnommen werden, woher die porcinen Sequenzen stammen, in denen potentiell geeignete Mikrosatellitenmotive identifiziert wurden.

„n Motive getestet“ gibt die Zahl der Motive an, die den Optimierungsprozess durchlaufen haben. Der Spalte „Als Marker etabliert“ ist zu entnehmen, wieviele der getesteten Motive als Marker etabliert werden konnten; die Bezeichnungen „MS X“ entsprechen jeweils dem Labornamen der Marker. Die letzte Spalte gibt die zu jedem etablierten Marker zugehörigen PIC-Werte auf Basis der Allelverteilungen in der Kontrollkohorte an.

* BAC-Klone wurden von Herrn Prof. T. Leeb zur Verfügung gestellt.

**Klon RP44-362L19 wurde im Labor von Herrn Prof. T. Leeb sequenziert und die Sequenz zur Verfügung gestellt. Die übrigen BAC-Klone wurden bei den entsprechenden Anbietern bestellt (siehe Anhang) und am HZI Braunschweig sequenziert.

¹diese Gene befinden sich im humanen Genom in derselben Region, sodass sie für die Markerentwicklung zusammengefasst werden konnten

²Die Optimierung der Primerpaare für diese Marker wurde von Frau Silke Hedtfeld durchgeführt

³Zur Sequenzierung des Schweinegenoms wurden vier verschiedene BAC-Bibliotheken angelegt, die auf unterschiedliche Ausgangstiere zurückgehen:

„CH242“-Klone stammen aus der von Baoli Zhu in Pieter de Jongs Labor des BACPAC-Resource Centers angelegten porcinen CHORI-242-BAC-Bibliothek; CHORI: Children's Hospital Oakland Research Institute; die Sequenzen wurden generiert auf der Basis der DNA aus der Blutprobe eines weiblichen Duroc Tiers von der Universität von Illinois (Herdlinien ID: 2-14)

„RP44“-Klone stammen aus der von Chung-Li Shu in Pieter de Jongs Labor des BACPAC-Resource Centers angelegten porcinen BAC-Bibliothek; die Sequenzen wurden generiert auf der Basis von gepoolten Blutproben von vier männlichen Schweine mit folgender Rassenzusammensetzung: 1/4 Meishan, 3/8 Yorkshire, and 3/8 Landrasse

„PigE“-Klone stammen aus der von Alan Archibald bei ARK-Genomics angelegten porcinen BAC-Bibliothek; die Sequenzen wurden generiert auf der Basis der DNA aus der Blutprobe von einem männlichen Tier der F1 Generation aus der Kreuzung von Large White mit Meishan

„Pigl“-Klone stammen aus der vom INRA-BAC-YAC-Resource-Centers angelegten porcinen BAC-Bibliothek; die Sequenzen wurden generiert auf der Basis der DNA aus Hautfibroblasten eines männlichen Tieres (unbekannte Rasse)

Siehe auch Tabelle 16 im Anhang.

Für 35 der 48 Kandidatengene ist es gelungen, innerhalb der zur Verfügung stehenden Sequenzen Mikrosatellitenmotive zu identifizieren, die als Marker etabliert werden konnten. Insgesamt standen somit prinzipiell 36 Marker für die nachfolgenden genetischen Diversitätsuntersuchungen und die Assoziationsstudie zur Verfügung.

Für die Gene SARM1, TNFRSF4, TNFRSF18, TNFRSF9, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D und TNFRSF11A konnte bislang keins der in den zur Verfügung stehenden Sequenzen identifizierten Mikrosatellitenmotive als Marker etabliert werden.

Für die Gene PG-1, TLR5, IL12RB1 und TNFRSF6B standen zu Beginn des Projektes weder Sequenzen in NCBI zur Verfügung noch konnten BAC-Klone mit dem gewünschten Gen identifiziert werden, so dass für diese Gene keine Mikrosatellitenmotive für die Markerentwicklung identifiziert werden konnten.

Um das Projekt voranzubringen und mit der Genotypisierung der Kohorten beginnen zu können, wurde die Markerentwicklung für die Kandidatengene nach ca. der Hälfte der Projektzeit beendet. Die Bearbeitung der Gene, für die bis dahin kein Marker entwickelt werden konnte, wurde zunächst zurückgestellt.

Alle Primersequenzen, die zugehörigen optimalen PCR-Bedingungen, Informationen zu den Mikrosatellitenmotiven und die Produktgröße des Referenzmotivs sind im Anhang unter 6.4 zu finden.

Die parallele Optimierung mehrerer Primerpaare führte dazu, dass für einige Gene mehrere Marker etabliert werden konnten. Der informativste Marker, d.h. der Marker mit dem höchsten PIC-Wert, wurde eingesetzt zur Genotypisierung der verschiedenen Tierkohorten. Die Rohdaten für die PIC-Wertbestimmung in der Kontrollkohorte finden sich im Anhang unter 6.6.1.

3.1.2 Klassifizierung der Mikrosatellitenmotive

Nach Auswahl des jeweils informativsten Markers für einen Genlocus standen schließlich 27 Marker für die nachfolgenden Genotypisierungen zur Verfügung.

Diese Marker wurden nach der Erstbetrachtung im Verlauf der PIC-Wertbestimmung den drei Güteklassen A, B und C zugeordnet. Die Einteilung erfolgte ausschließlich aufgrund der Auswertbarkeit der Primärdaten der Motive und nicht aufgrund der Informativität der Marker, d.h. auch Marker mit kleinem PIC-Wert wurden zum Teil in die Güteklasse A eingeteilt.

Die Tabelle 4 gibt einen Überblick darüber, wieviele und welche Marker jeweils den drei Güteklassen zugeordnet wurden und für welche Kandidatengene sie entwickelt wurden.

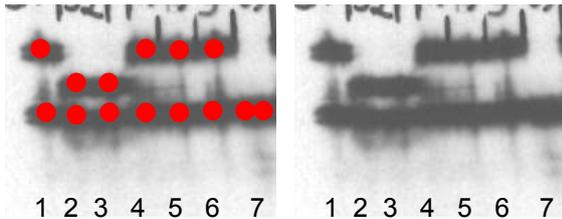
Tabelle 4: Einteilung der Marker in Güteklassen nach Lesbarkeit

Güteklasse	Anzahl Marker	Marker für Kandidatengen(e)	Markername /PIC-Wert
A	13	Tyk2	MS 2: 0,39
		TFR1	MS 9: 0,36
		TFR2	MS 1: 0,82
		pBD1	MS 4: 0,26
		TLR2	MS 5: 0,38
		TLR4	MS 1: 0,78
		IFNGR1	MS 3: 0,73
		IFNAR1 / IFNGR2	MS 2: 0,72
		CXCR2	MS 1: 0,59
		TNFRSF11B	MS 3: 0,66
		TNFRSF12A	MS 1: 0,55
		TNF α / β	MS 1: 0,81
		NRAMP1	MS 1: 0,36
B	5	TNFRSF1A / 7	MS 1: 0,51
		CD95	MS 5: 0,85
		Transferrin	MS 1: 0,79
		TLR3	MS 1: 0,74
		TLR9	MS 1: 0,69
C	9	CD14	MS 10: 0,80
		BPI	MS 3: 0,49
		PR39	MS 1: 0,77
		TLR1/6/10	MS 3: 0,79
		TLR7/8	MS 2: 0,76
		TNFRSF1B / 8	MS 1: 0,49
		IL12Rb2 / IL23R	MS 3b: 0,65
		IL18R1	MS 6: 0,51
CD40	MS 3: 0,74		

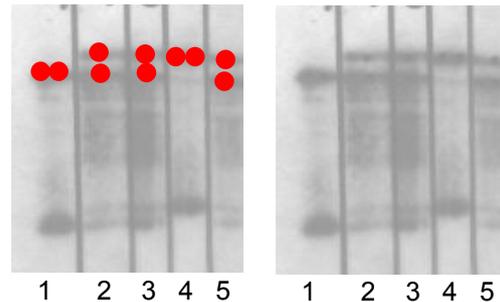
Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele für Primärdaten, d.h. auf Röntgenfilmen visualisierte PCR-Produkte, für alle 27 entwickelten Marker, um die Bandbreite der verschiedenen Mikrosatellitenmotive zu veranschaulichen und die Einteilung in die verschiedenen Güteklassen zu erläutern.

1. Marker der Güteklasse A

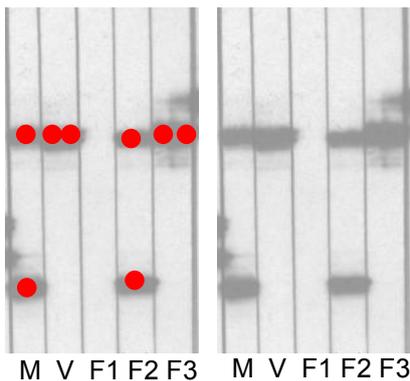
1. Marker für Tyk2, (ttgt)₇



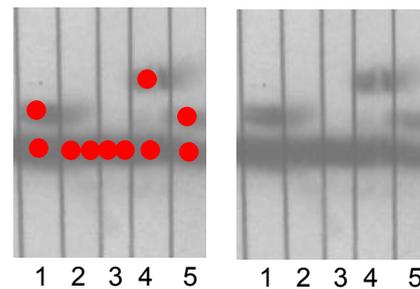
2. Marker für TFR1, (gt)₇



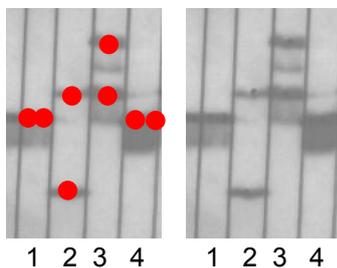
3. Marker für TFR2, (aaag)₁₇



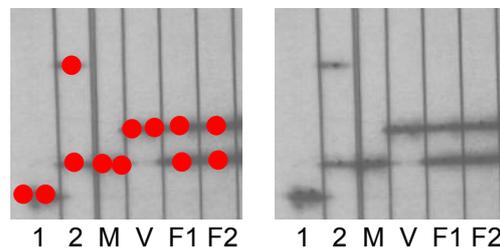
4. Marker für pBD1, (attt)₈



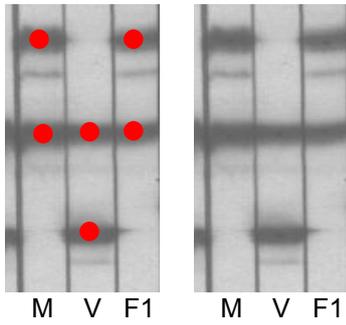
5. Marker für TLR2, (aat)₁₁



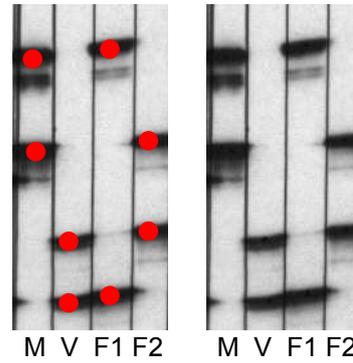
6. Marker für TLR4, (ataa)₁₂



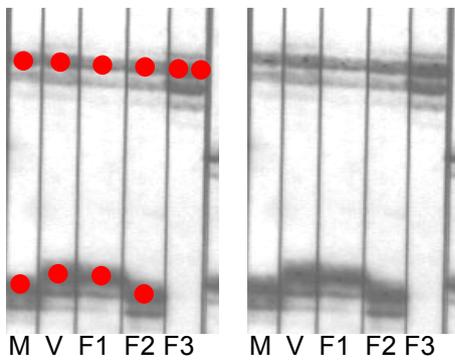
7. Marker für IFNGR1,
(aaga)₁₃



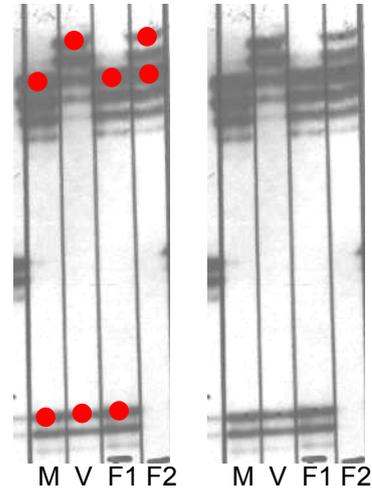
8. Marker für IFNAR1/IFNGR2,
(atag)₁₃+(agac)₇



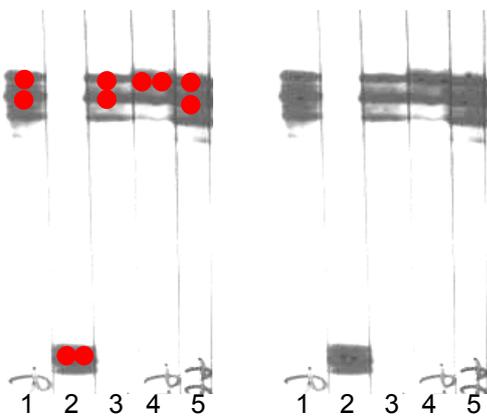
9. Marker für CXCR2,
(ca)₂₃



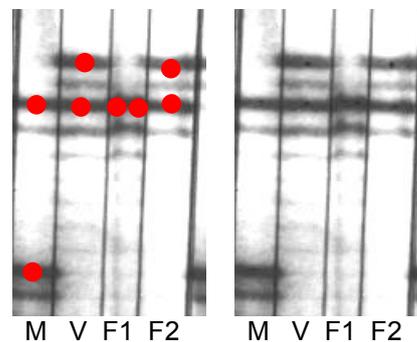
10. Marker für TNFRSF11B,
(ac)₂₁



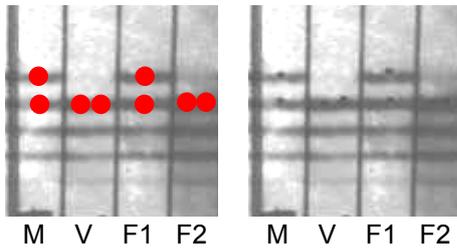
11. Marker für TNFRSF12A,
(ca)₁₉



12. Marker für TNF α / β
(ctg)₂₀

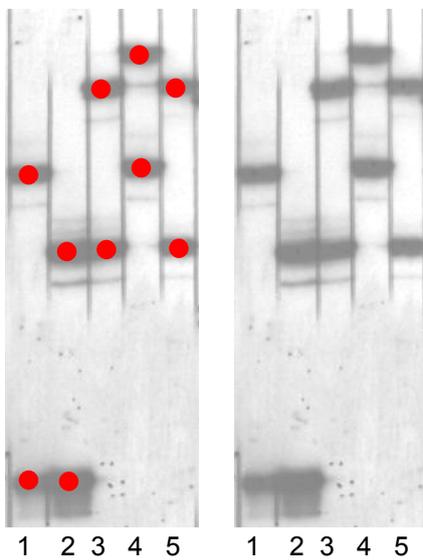


13. Marker für NRAMP1,
(ca)₂₀

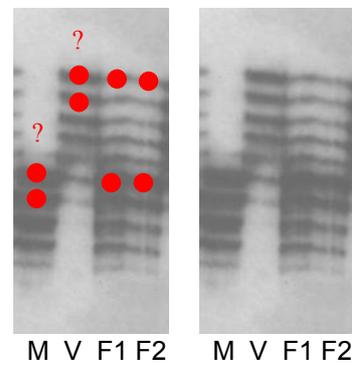


2. Marker der Güteklasse B

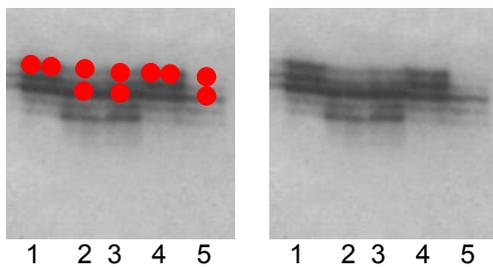
1. Marker für CD95,
(aaag)₂₂



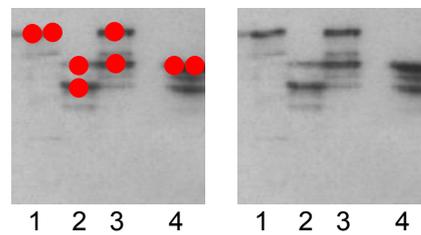
2. Marker für Transferrin,
(gt)₁₈



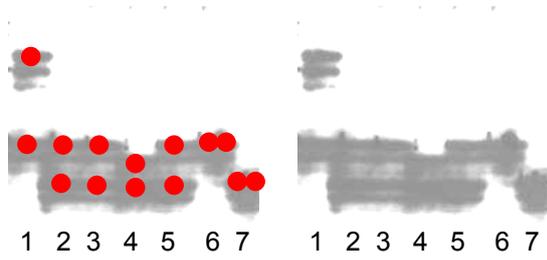
3. Marker für TLR3,
(ac)₁₉



4. Marker für TLR9,
(ac)₄₂

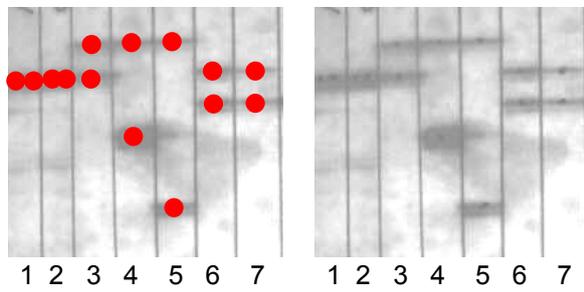


5. Marker für TNFRSF1A / 7, (gt)₁₁

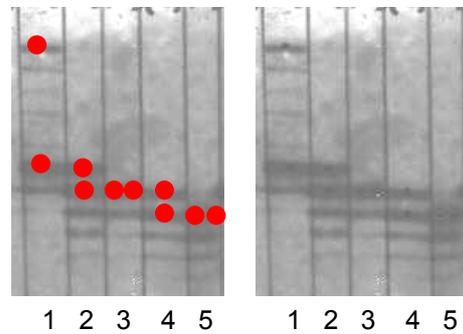


3. Marker der Güteklasse C

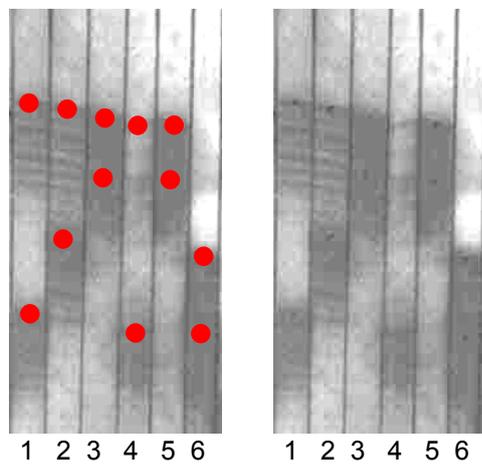
1. Marker für CD14, (tttc)₈



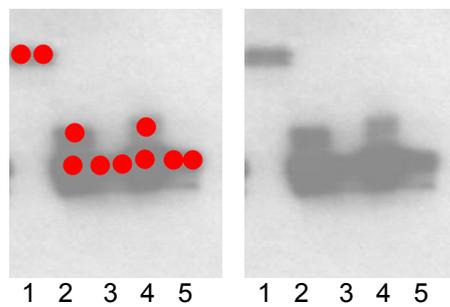
2. Marker für TNFRSF1B / 8, (gt)₁₉



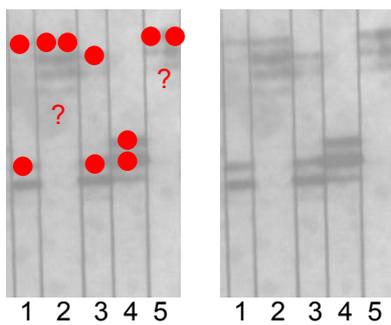
3. Marker für TLR1/6/10, (gt)₁₅



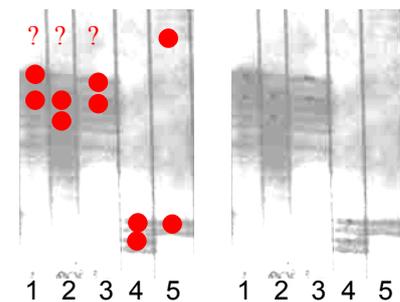
4. Marker für BPI, (ta)₁₅



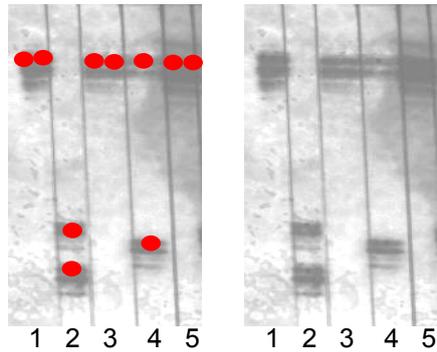
5. Marker für IL12Rb2 / IL23R, (ac)₁₃



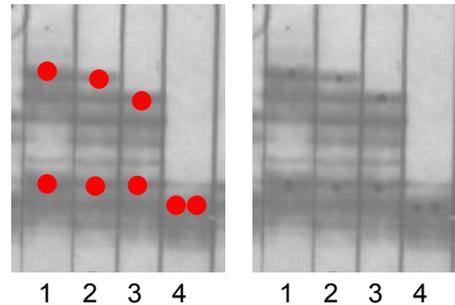
6. Marker für IL18R1, (tg)₁₄



7. Marker für CD40, (ac)₁₉



8. Marker für PR39, (ca)₁₉



9. Marker für TLR7 / 8, (atct)₁₁

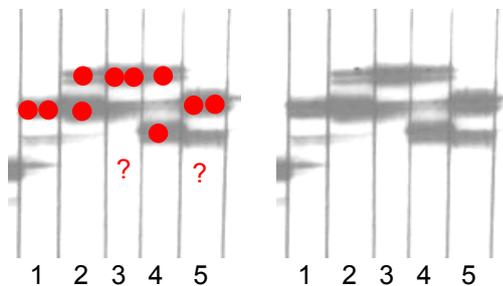


Abbildung 9: Auf Röntgenfilm visualisierte PCR-Produkte für 27 etablierte Marker, sortiert nach Güteklasseneinteilung

Die als Hauptallele identifizierten Banden der gezeigten Proben sind jeweils im linken Bild mit roten Punkten markiert. Zwei Punkte auf einer Bande kennzeichnen homozygote Genotypen. Die Zahlen unter den Abbildungen bezeichnen die verschiedenen aufgetragenen Proben unverwandter Tiere. Für einige Marker wurden Proben von Familien dargestellt, wobei M = Mutter, V = Vater, F1 = Ferkel1, F2 = Ferkel 2 usw. bedeutet. Außerdem wurde für jeden Marker das zugrundeliegende Motiv angegeben. Die Motivlängen entsprechen der Größe des Motivs in der Referenzsequenz, in der das Motiv identifiziert wurde.

3.1.2.1 Diskussion der Markereinteilung

Die 13 Marker, die der Güteklasse A zugeordnet wurden, zeichnen sich dadurch aus, dass die verschiedenen auftretenden Hauptallele der Proben in allen untersuchten Kohorten aufgrund von klar erkennbaren Bandenmustern von während der PCR gebildeten Nebenprodukten unterschieden werden konnten. Homozygote und heterozygote Individuen waren auch ohne Familienanalysen eindeutig zu unterscheiden.

Die Marker für Tyk2, TFR1, pBD1, TLR2 und NRAMP1 wurden trotz ihrer kleinen PIC-Werte in die Güteklasse A eingeordnet, da die Bandenmuster technisch gut

auswertbar waren. Der geringe PIC-Wert von 0,36 für NRAMP1 ist dadurch zu erklären, dass in der für die PIC-Wertbestimmung gewählten Kontrollkohorte nur drei der nach der Genotypisierung aller Kohorten insgesamt sieben identifizierten Allele aufgetreten sind. Bei Berechnung des PIC-Werts aufgrund der Allelfrequenzen über alle typisierten Kohorten steigt der Werte auf 0,45 (siehe 3.2.1, Tabelle 7).

Fünf der 27 entwickelten Marker wurden der Güteklasse B zugeordnet. Der Marker für CD95 hat zwar mit 0,85 einen hohen PIC-Wert, allerdings war die Auswertung der Bandenmuster schwierig, so dass die Auswertung der Primärdaten einen erhöhten Zeitaufwand erforderte. Für den Mikrosatellitenmarker für CD95 wurden 22 verschiedene Allele in den Kohorten identifiziert, bei denen sich das kleinste Allel um 16 Repeateinheiten von dem größten Allel unterschied. Zu dieser großen Spreizung kam erschwerend hinzu, dass bei diesem Marker viele Allele aufgetreten sind, bei denen die Sequenz des ursprünglichen Motivs $(aaag)_{22}$ im Laufe der Evolution aufgrund von Leserasterverschiebungen innerhalb des Motivs nicht immer komplett, sondern nur teilweise verdoppelt oder herausgeschnitten wurde, so dass auch unterbrochene Motive wie beispielsweise $(m)_{22}+(1/2m)_1$ auftraten, wobei m für das ursprüngliche Motiv steht. Eine sichere Größenkalibrierung der Allele wurde dadurch gewährleistet, dass alle Proben nach der ersten Analyse entsprechend ihrer zunächst nur vermuteten Allelgröße sortiert und anschließend erneut analysiert wurden. Da die Auswertung der Rohdaten zwar mit erhöhtem Zeitaufwand verbunden war, aber eine sichere Zuordnung der Allele dennoch möglich war, wurde dieser Marker für die weiteren Genotypisierungen verwendet.

Die Marker für TNFRSF1A/7, Transferrin, TLR3 und TLR9 wurden der Güteklasse B zugeordnet, da die Diskriminierung zwischen homo- und heterozygoten Individuen aufgrund vieler Nebenbanden schwierig ist. Die Haupt- und Nebenbanden liegen zum einen sehr nah beieinander und zum anderen sind sie auch hinsichtlich ihrer Intensität vergleichbar. Erschwerend kam hinzu, dass für die meisten Kohorten keine Familien für die Auswertung zur Verfügung standen, so dass in Zweifelsfällen nicht auf Genotypen aufgrund der Mendelschen Vererbungsgesetze geschlossen werden konnte.

Der Marker für Transferrin wurde wegen der hohen Relevanz des Gens für das Projekt trotz des Wissens um möglicherweise einiger falsch interpretierter Genotypen für die weiteren Genotypisierungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Die Marker für TNFRSF1A/7, TLR3 und TLR9 wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht für weitere Analysen verwendet.

Neun der 27 entwickelten Marker wurden in die Güteklasse C eingeordnet und nicht für weitere Genotypisierungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet, da für alle diese Marker die technische Reproduzierbarkeit nicht gewährleistet ist, d.h. nicht jeder Genotyp ist eindeutig lesbar. Im Gegensatz zu den Markern in Güteklasse B kommen bei den Markern in Güteklasse C mehrere Probleme zusammen. Bei allen neun Markern wurden im Verlauf ihrer Amplifikation viele Nebenprodukte gebildet. Außerdem traten bei allen Markern sehr viele kleine Allele auf, während die wenigen Großen nur sehr schwach amplifiziert wurden. Dies führte bei der Auswertung zum Teil dazu, dass Individuen als homozygot interpretiert wurden, die eigentlich heterozygot sind.

Für die Marker für PR39 und TLR7/8 ist z.B. erst bei der Typisierung von Familien klar geworden, dass es sich bei zuvor als Hauptbanden identifizierten Banden aufgrund der Mendelschen Vererbungsregeln um Nebenprodukte handeln muss. Dies hat zur Folge, dass alle bereits ausgewerteten Rohdaten neu evaluiert werden müssen.

3.1.3 Zusammenfassung der Mikrosatellitenentwicklung

48 ausgewählte Kandidatengene wurden in die Mikrosatellitenmarkerentwicklung einbezogen. Für 11 Kandidatengene standen dafür porcine Sequenzen in der NCBI Datenbank zur Verfügung, während für 33 Kandidatengene insgesamt 25 porcine BAC-Klone sequenziert werden mussten, um die gewünschte Sequenz zu erhalten. Für vier Kandidatengene standen zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit keine porcinen Sequenzen zur Verfügung.

Insgesamt wurden 128 Mikrosatellitenmotive im Verlauf dieser Arbeit getestet. Davon konnten 36 Motive als Marker etabliert werden, die 35 der 48 untersuchten Kandidatengene abdecken (Für 8 Kandidatengene wurden mehrere Marker etabliert). Für neun Kandidatengene konnte keins der Mikrosatellitenmotive als Marker etabliert werden, das in den zur Verfügung stehenden Sequenzen identifiziert wurde.

Aus den 36 etablierten Markern wurde für jedes Kandidatengen der Marker mit dem höchsten PIC-Wert ausgewählt. Damit blieben 27 Marker übrig, die prinzipiell für die nachfolgenden Genotypisierungen zur Verfügung standen.

Diese Marker wurden aufgrund ihrer technischen Auswertbarkeit in die drei Güteklassen A, B und C eingeteilt. 13 Marker wurden der Güteklasse A, 5 Marker der Güteklasse B und 9 Marker der Güteklasse C zugeordnet. Folglich ist ca. die Hälfte der etablierten Marker leicht auswertbar, während die Auswertung der übrigen Marker aus unterschiedlichen Gründen mit einem erhöhten Zeitaufwand verbunden ist.

In der Güteklasse A finden sich sowohl fünf Marker bestehend aus Dinukleotidrepeatmotiven als auch acht Marker bestehend aus Tri- und Tetranukleotidrepeatmotiven. In beiden Repeatsorten finden sich sowohl informative als auch nicht informative Marker. Daran ist zu erkennen, dass einem Repeatmotiv im Vorfeld nicht angesehen werden kann, ob es sich als Marker etablieren lässt oder nicht. Allerdings werden bei der Amplifikation von Mikrosatellitenmotiven, die aus größeren Grundeinheiten wie Tri- oder Tetrarepeats bestehen, in der Regel weniger Nebenprodukte gebildet, was die Diskriminierung zwischen homo- und heterozygoten Individuen erleichtert. Dies bestätigt sich dadurch, dass es sich bei 12

von 14 Mikrosatellitenmotiven der Güteklassen B und C um Dinukleotidrepeatmotive handelt.

Aus den 27 etablierten Markern wurden zur Beurteilung der Alleldiversität in den verschiedenen Kohorten für die Genotypisierung 12 Marker der Güteklassen A und B ausgewählt, die aufgrund der Beschaffenheit des Mikrosatellitenmotivs im Zeitrahmen dieser Arbeit eindeutig ausgewertet werden konnten.

Die verwendeten Marker wurden für die folgenden 14 Kandidatengene entwickelt:

- | | |
|--------------------------|------------------|
| 1. Tyk2 | 8. IFNGR2 |
| 2. CD95 | 9. CXCR2 |
| 3. Transferrin | 10. TNFRSF11B |
| 4. Transferrinrezeptor 2 | 11. TNFRSF12A |
| 5. TLR4 | 12. TNF α |
| 6. IFNGR1 | 13. TNF β |
| 7. IFNAR1 | 14. NRAMP1 |

Die Gene IFNAR1/ IFNGR2 und TNF α / β werden jeweils mit einem Marker abgedeckt.

3.2 Genotypisierung der Kohorten

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick darüber, wieviele Proben für alle 27 entwickelten Marker im Laufe dieser Arbeit genotypisiert wurden und wieviele unterschiedliche Allele pro Marker in der Kontrollkohorte und nach der Typisierung aller Kohorten identifiziert werden konnten.

Tabelle 5: Überblick über typisierte Probenanzahl und identifizierte Allele

Kandidatengen(e)	n Tiere für PIC-Wert	n Allele PIC	n Tiere gesamt	n Allele gesamt
TNFRSF1A / TNFRSF7	52	4	-	-
Tyk2	52	3	290**	4
CD14	47	10	-	-
CD95	44	13	308	22
BPI	50	10	-	-
Transferrin	51	7	328*	12
Transferrinrezeptor 1	43	2	-	-
Transferrinrezeptor 2	51	9	315	13
PBD-1	51	3	-	-
PR-39	48	10	-	-
TLR1 / 6 / 10	52	15	-	-
TLR2	49	4	-	-
TLR3	41	7	-	-
TLR4	32	8	298	12
TLR7 / TLR8	50	6	-	-
TLR9	37	7	-	-
TNFRSF1B / 8	52	4	-	-
IFNGR1	48	10	316	11
IFNAR1 / IFNGR2	49	6	310	11
CXCR2 (=IL8R1)	45	10	312	15
IL12RB2 / IL23R	45	6	-	-
IL18R1	53	7	-	-
CD40	52	9	-	-
TNFRSF11B	49	10	316	13
TNFRSF12A	51	6	313	12
TNF α/β	50	11	314	12
NRAMP1	51	3	317	7

Den Spalten „n Tiere für PIC-Wert“ und „n Allele PIC“ ist zu entnehmen, wieviele Tiere aus der Kontrollkohorte für die Bestimmung des PIC-Wertes genotypisiert wurden und wieviele verschiedene Allele in dieser Kohorte aufgetreten sind.

Die Spalten „n Tiere gesamt“ und „n Allele gesamt“ geben Auskunft darüber, wieviele Tiere insgesamt im Verlauf dieser Arbeit für den jeweiligen Marker genotypisiert wurden und wieviele verschiedene Allele insgesamt in den Kohorten identifiziert werden konnten. Die Zahl der Tiere in der Spalte „n Tiere gesamt“ setzt sich aus folgenden Kohorten zusammen: Kontrollkohorte, Verbraucherstudie, Herdlinientiere, Wildschweine, Schwäbisch-Hällische Schweine, Leicoma, Wollschweine, Bunte Bentheimer, Angler-Sattelschweine, Mini-Lewe, und aus den Infektionsversuchen jeweils Ferkel der Rassen Pietrain, Hampshire und Deutsche Landrasse.

*Aus Zeitgründen konnten bis jetzt nur für den Transferrin-Marker die Ferkel der Deutschen Edelschweine (Large White) aus den Infektionsversuchen typisiert werden.

**Für den Tyk2-Marker wurden die Pietrain-Ferkel wegen technischer Probleme noch nicht typisiert.

3.2.1 Bewertung der Vorgehensweise zur Informativitätsbestimmung eines Markers

Die für diese Arbeit gewählte Vorgehensweise zur Etablierung eines Mikrosatellitenmotivs als informativem Marker beruhte auf der Annahme, dass bereits fünf Proben unverwandter Schweine ausreichend sind, um die generelle Allelvielfalt eines Markermotivs in verschiedenen Populationen abschätzen zu können.

Außerdem wurde davon ausgegangen, dass der auf Basis der Allelfrequenzen in einer Kontrollkohorte (bestehend aus 53 Tieren) berechnete PIC-Wert repräsentativ ist für den generellen PIC-Wert des Markers.

Bei einem optimalen Marker sollte der Gesamt-PIC-Wert im Vergleich zu dem Kontroll-PIC-Wert also entweder gleich bleiben oder größer werden und die Anzahl der verschiedenen beobachteten Allele sollte mit steigender typisierter Probenzahl größer werden bzw. gleich bleiben. Dies wäre ein Beleg dafür, dass sowohl die für die Optimierung gewählten Proben als auch die gesamte Kontrollkohorte als Stichprobe zur Bestimmung der Informativität eines Markers geeignet sind.

Um diese Annahmen zu überprüfen, wurde für 12 Marker neben dem Kontroll-PIC-Wert zusätzlich der Gesamt-PIC-Wert berechnet. Dieser basiert auf den Allelfrequenzen in allen typisierten Proben.

Außerdem wurde für diese 12 Marker die Anzahl an beobachteten unterschiedlichen Allelen in den initialen fünf Kontrollproben (die aus der Schlachthofkohorte ausgewählt wurden) verglichen mit der Anzahl an beobachteten Allelen in der gesamten Schlachthofkontrollkohorte. Die Anzahl an beobachteten Allelen in der Kontrollkohorte wurde wiederum verglichen mit der Anzahl unterschiedlicher identifizierter Allele in allen Kohorten.

Den folgenden Tabellen 6 und 7 sind die dazugehörigen Daten zu entnehmen und in den Abbildungen 10 und 11 wurden die Daten grafisch dargestellt.

Tabelle 6: Vergleich der identifizierten Allelanzahl

Marker für Gen(e)	n Allele nach Opt.	n Allele Kontrollkohorte	n Allele gesamt
Tyk2	3	3	4
CD95	5	13	22
Transferrin	7	7	12
TFR2	5	9	13
TLR4	3	8	12
IFNGR1	5	10	11
IFNAR1 / IFNGR2	5	6	11
CXCR2	5	10	15
TNFRSF11B	5	10	13
TNFRSF12A	4	6	12
TNF α / β	7	11	12
NRAMP1	2	3	7

Opt.: Optimierung

Tabelle 7: Vergleich PIC-Kontrolle vs. PIC-Gesamt

Marker für Gen(e)	PIC Kontrollkohorte	PIC Gesamt
Tyk2	0,39	0,38
CD95	0,85	0,87
Transferrin	0,79	0,77
TFR2	0,82	0,74
TLR4	0,78	0,74
IFNGR1	0,73	0,84
IFNAR1 / IFNGR2	0,72	0,79
CXCR2	0,59	0,71
TNFRSF11B	0,66	0,63
TNFRSF12A	0,55	0,55
TNF α / β	0,81	0,83
NRAMP1	0,36	0,45

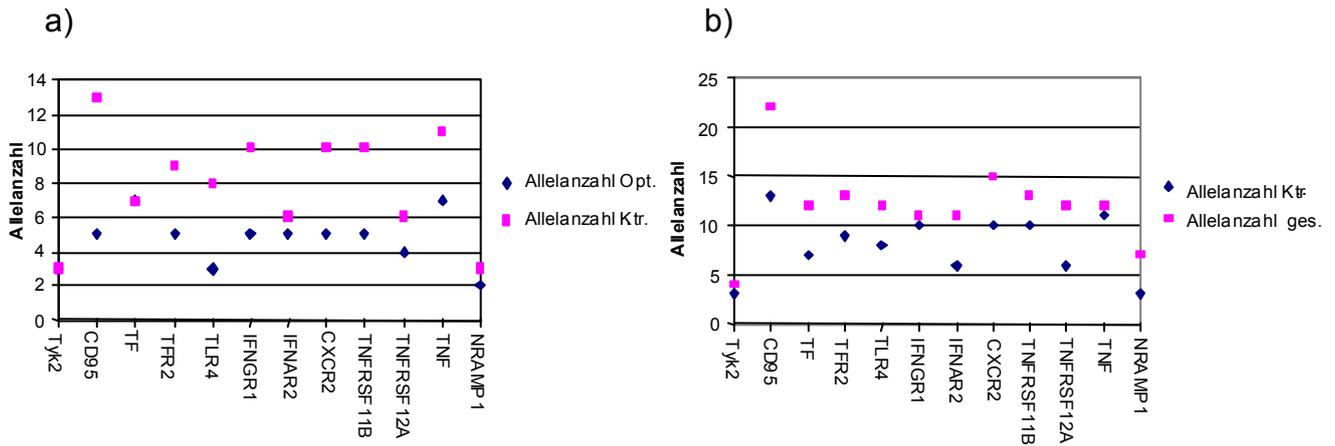


Abbildung 10: Vergleich der Allelanzahlen in verschiedenen Kohorten
 Auf der X-Achse sind in beiden Teilfiguren jeweils die 12 betrachteten Markerloci dargestellt.
 Auf der Y-Achse sind in Teilfigur a) für jeden Locus die Anzahl an identifizierten unterschiedlichen Alleln in den fünf Optimierungspersonen (Allelanzahl Opt.) und in der 53 Tiere umfassenden Kontrollkohorte (Allelanzahl Ktr.) abzulesen. Die Proben für die Optimierung waren für alle Marker identisch. In Teilfigur b) ist auf der Y-Achse erneut die Allelanzahl in der Kontrollkohorte zu jedem Markerlocus abzulesen im Vergleich zu der Allelanzahl, die insgesamt in allen Kohorten beobachtet wurde (Allelanzahl ges.).

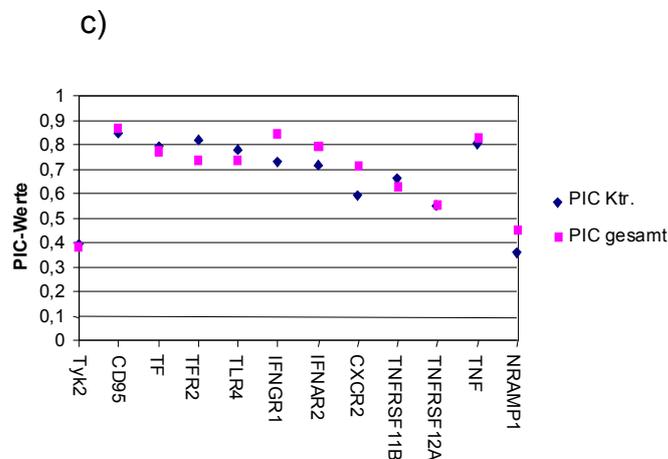


Abbildung 11: Vergleich der PIC-Werte in der Kontrollkohorte vs. Gesamt-PIC-Wert
 Auf der X-Achse sind die 12 betrachteten Markerloci dargestellt.
 Auf der Y-Achse sind die PIC-Werte für jeden Marker abzulesen, die sich auf Basis der Allelfrequenzen in der Kontrollkohorte ergeben (PIC Ktr.) im Vergleich zu dem auf Basis aller Beobachtungszahlen eines Allels in allen Kohorten berechneten PIC-Wertes (PIC gesamt).

Die Auswertung der Daten bzw. der Grafiken erlaubt den Schluss, dass die für diese Arbeit gewählte Vorgehensweise zur Etablierung eines informativen Mikrosatellitenmarkers sinnvoll ist.

Beim Vergleich der beobachteten Allelzahlen in den Optimierungsproben, der Kontrollkohorte und gesamt in allen Kohorten (Abbildung 10) zeigt sich, dass auch die Anzahl an identifizierten Allelen an allen 12 betrachteten Loci mit steigender Zahl der genotypisierten Tiere zunimmt. Lediglich am Markerlocus für Tyk 2 wurden in der gesamten Kontrollkohorte keine weiteren Allele beobachtet im Vergleich zu den fünf für die Optimierung gewählten Proben.

Beim Vergleich der PIC-Werte für die 12 Marker berechnet auf Basis der Allelfrequenzen in der Kontrollkohorte mit dem Gesamt-PIC-Wert auf Basis aller Beobachtungszahlen (Abbildung 11) zeigt sich, dass die Kontrollkohorte als Stichprobe geeignet ist, um auf die generelle Informativität eines Markers zu schließen. An 7 von 12 Markerloci wird der PIC-Wert größer, wenn die Beobachtungszahlen aller Allele in allen Kohorten die Basis für die Berechnung bilden. Für fünf der 12 Markerloci liegt der Gesamt-PIC-Wert zwar etwas niedriger als der Kontroll-PIC-Wert, aber die beiden Werte bewegen sich dennoch in der gleichen Größenordnung.

3.3 Alleldiversitätsstudie

3.3.1 Heterozygotietest für die Verbraucherstudienkohorte

Für die Verbraucherstudienkohorte wurde postuliert, dass es sich um eine Outbred-Population aus unverwandten Tieren handelt, die den Genpool repräsentiert, der in derzeit in Deutschland konsumiertem Schweinefleisch vorhanden ist.

Um diese Annahme statistisch zu belegen, wurde für die Verbraucherstudienkohorte für 11 der 12 für die Untersuchungen ausgewählten Markerloci (3.1.3) der Heterozygotieindex H berechnet (siehe 2.10.2). Der Marker für Tyk2 wurde nicht berücksichtigt, da lediglich zwei unterschiedliche Allele in der Verbraucherstudienkohorte aufgetreten sind, und der Marker somit nicht informativ ist.

Auf Basis des Heterozygotieindexes wurde anschließend für jeden Markerlocus berechnet, wieviele heterozygote und wieviele homozygote Tiere in der Verbraucherstudie zu erwarten sind, falls es sich tatsächlich um eine Outbred-Population handelt.

Falls mehr homozygote Tiere beobachtet werden als erwartet, so kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um eine Outbred-Population unverwandter Tiere handelt. Falls jedoch weniger homozygote Tiere beobachtet werden als erwartet bzw. mehr heterozygote Tiere als erwartet, so ist dies meist auf Genotypisierungsfehler zurückzuführen.

Darauf folgte der Vergleich der Soll-Werte mit den tatsächlichen Beobachtungszahlen mit Hilfe der Clump-Software. Es wurden jeweils eine Million Simulationen durchlaufen. Zur Beurteilung der Signifikanz wurde der p -Wert aus dem T1 Algorithmus der Software angegeben. Ab einem p -Wert $< 0,05$ wurde ein Vergleich als signifikant unterschiedlich bewertet. Für alle Vergleiche mit einem p -Wert $> 0,05$ besteht demnach kein signifikanter Unterschied zwischen dem Erwartungs- und Beobachtungswert für hetero- bzw. homozygote Tiere.

Tabelle 8: Heterozygotietest für die Verbraucherstudie

Marker für	H [%]*	n typ.	Soll het.	Ist het.	Soll homo.	Ist homo.	p-Wert
CD95	87	65	57	51	8	14	0,247375
TF	80	66	53	62	13	4	0,035087
TFR2	74	65	48	49	17	16	1,000000
TLR4	80	68	54	42	14	26	0,037658
IFNGR1	85	67	57	58	10	9	1,000000
IFNAR1/ IFNGR2	82	63	52	54	11	9	0,807589
CXCR2	76	66	50	57	16	9	0,181813
TNFRSF 11B	63	66	42	46	24	20	0,579927
TNFRSF 12A	64	65	42	38	23	27	0,588370
TNF α/β	85	66	56	61	10	5	0,272126
NRAMP1	50	66	33	37	33	29	0,601206

* H auf Basis der Allelfrequenzen in der Verbraucherstudienkohorte

n typ.: Anzahl der für den jeweiligen Marker typisierten Tiere; entspricht 100 % für die Berechnung der Soll-werte bzw. der Ist-Werte

Soll het. / Soll homo.: auf Basis des Heterozygotieindex berechnete Anzahl der erwarteten hetero- bzw. homozygoten Tiere

Ist het. / Ist homo.: tatsächlich beobachtete Anzahl hetero- bzw. homozygoter Tiere

Wie aus der Tabelle 8 zu ersehen ist, ist der berechnete p-Wert für die Vergleiche zwischen Soll- und Ist-Werten für homo- bzw. heterozygote Tiere an 9 von 11 Markerloci $> 0,05$. Somit bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Erwartungswert und dem Sollwert. Damit wird als bewiesen angenommen, dass es sich bei der Verbraucherstudienkohorte tatsächlich um eine Outbred-Population aus unverwandten Tieren handelt, die als Referenzkohorte für die nachfolgenden Untersuchungen herangezogen werden kann.

Am Markerlocus für Transferrin wurden signifikant mehr heterozygote bzw. weniger homozygote Tiere beobachtet als erwartet. Wahrscheinlich ist dieses Ergebnis auf nicht vermeidbare Fehler während der Auswertung der Genotypisierungsrohdaten zurückzuführen und damit kein biologisch bedeutsames Ergebnis. Wie bereits unter 3.1.2.1 beschrieben, wurde der Marker wegen der Schwierigkeit, hetero- und homozygote Individuen zu diskriminieren, in die Güteklasse B eingeordnet. Die beschriebenen Unsicherheiten bei der Auswertung der Genotypisierungsrohdaten spiegeln sich in dem Ergebnis an dieser Stelle wider.

Am Markerlocus TLR4 wurden mehr homozygote Tiere in der Verbraucherstudie beobachtet als erwartet.

Der hauptsächlich auf der Oberfläche von Leukozyten exprimierte Rezeptor TLR4 gehört zur Familie der Toll-like-Rezeptoren, die eine wesentliche Rolle bei der

Erkennung von Pathogenen und der anschließenden Aktivierung des angeborenen Immunsystems spielen, indem die Produktion von Cytokinen angeregt wird. TLR4 liegt als Homodimer vor und erkennt gemeinsam mit dem Corezeptor MD2 Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer Bakterien. Die Präsentation von LPS an den Rezeptorkomplex aus TLR4 und MD2 wird wiederum ermöglicht über die Corezeptoren CD14 und LBP (LPS Binding Protein).

Lipopolysaccharide werden beim Absterben von Bakterien als Endotoxine aus den Zellwänden freigesetzt.

Da die Endotoxinbelastung in Schweineställen sehr hoch ist, könnte die Beobachtung, dass viele Tiere aus der Verbraucherstudie am TLR4 Locus homozygot sind, darauf zurückzuführen sein, dass diese Homozygotie einen Vorteil für die Immunabwehr gegen die Endotoxine darstellt, wohingegen an diesem Locus heterozygote Tiere bereits vor der Schlachtreife sterben und somit in der Verbraucherstudie nicht erfasst wurden. Es würde sich also um einen sogenannten „Survivor effect“ handeln.

Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste eine Kohorte unverwandter Wildschweine typisiert werden. Freilebende Wildschweine dürften keinem Selektionsdruck durch erhöhte Endotoxinbelastung unterliegen, so dass erwartet wird, dass sich keine am TLR4 Locus homozygoten Tiere in der Population anreichern.

Da für die in dieser Arbeit verwendete Wildschweinkohorte keine Informationen über den Verwandtschaftsgrad der Tiere vorliegt, ist die Kohorte nicht geeignet, um diese Hypothese zu überprüfen.

3.3.2 Globaler Vergleich des Genpools aller untersuchten Kohorten mit der Verbraucherstudie

Um statistisch zu belegen, dass sich der Genpool aller im Verlauf dieser Arbeit untersuchten Kohorten generell signifikant von dem Genpool der als Referenzkohorte dienenden Verbraucherstudienkohorte unterscheidet, wurde eine Clump-Analyse durchgeführt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde jeweils der Genpool einer Kohorte kumulativ über 11 Markerloci mit dem jeweiligen Genpool in der Verbraucherstudie verglichen. Der angegebene p-Wert resultiert aus dem T1 Algorithmus der Clump-Software nach einer Million Simulationen.

Folgende 11 Markerloci wurden in die Analyse einbezogen:

- | | |
|--------------------------|------------------------|
| 2. CD95 | 9. TNFRSF12A |
| 3. Transferrin | 10. TNF α/β |
| 4. Transferrinrezeptor 2 | 11. NRAMP1 |
| 5. TLR4 | |
| 6. IFNAR1/IFNGR2 | |
| 7. CXCR2 | |
| 8. TNFRSF11B | |

Tabelle 9: Genpool der untersuchten Kohorten im Vergleich zur Kontrollkohorte der Verbraucherstudie

	Häufigkeit der Allele in den Kohorten		Vergleich der Allelfrequenzen
	VS	Herd.	p-Wert
Gemeinsame Allele	1344	1141	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	102	21	
	VS	WS	p-Wert
Gemeinsame Allele	895	340	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	551	96	
	VS	L	p-Wert
Gemeinsame Allele	1106	255	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	330	7	
	VS	SH	p-Wert
Gemeinsame Allele	1122	334	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	281	18	
	VS	AS	p-Wert
Gemeinsame Allele	817	82	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	629	4	
	VS	ML	p-Wert
Gemeinsame Allele	291	80	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	1155	8	
	VS	WoS	p-Wert
Gemeinsame Allele	602	318	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	844	30	

	Häufigkeit der Allele in den Kohorten		Vergleich der Allelfrequenzen
	VS	BB	p-Wert
Gemeinsame Allele	745	42	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	701	2	
	VS	Eltern Pt.	p-Wert
Gemeinsame Allele	1296	572	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	150	0	
	VS	Eltern Hp.	p-Wert
Gemeinsame Allele	863	436	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	583	26	
	VS	Eltern DL	p-Wert
Gemeinsame Allele	1041	258	0,000001
Nicht gemeinsame Allele	405	0	

VS: Verbraucherstudie

WS: Wildschweine

SH: Schwäbisch-Hällische Schweine

ML: Mini-Lewe

BB: Bunte Bentheimer

Hp.: Hampshire

Herd.: Herdlinientiere

L: Leicoma

AS: Angler-Sattelschweine

WoS: Wollschweine

Pt.: Pietrain

DL: Deutsche Landrasse

Bei den untersuchten Hampshire, Pietrain und Deutsche Landrasse Tieren handelt es sich um die Eltern der Ferkel aus den Infektionsversuchen.

Gemeinsame Allele: Summe aller Beobachtungszahlen über alle 11 Markerloci für die Allele einer Kohorte, die diese mit der Verbraucherstudie gemeinsam hat, und umgekehrt

Nicht gemeinsame Allele: Summe aller Beobachtungszahlen über alle 11 Markerloci für die Allele einer Kohorte, die diese mit der Verbraucherstudie **nicht** gemeinsam hat, und umgekehrt

Ein Beispiel:

Bei dem Vergleich der Verbraucherstudienkohorte mit den Eltern der Deutschen Landrasse Tiere aus den Infektionsversuchen gab es aus der Sicht der Verbraucherstudie insgesamt für alle 11 Marker 1041 Beobachtungen von Allelen, die sowohl in der Verbraucherstudie als auch bei den Deutsche Landrasse Tieren auftraten und 405 Beobachtungen von Allelen, die nur in der Verbraucherstudie und nicht bei den Deutsche Landrasse Tieren identifiziert wurden.

Aus Sicht der Deutschen Landrasse Tiere waren alle 258 gezählten Allele solche, die auch in der Verbraucherstudie auftraten und es wurden keine Allele beobachtet, die nur in den Deutsche Landrasse Tieren identifiziert wurden.

Das Ergebnis der Clump-Analysen zeigt für alle 11 Vergleiche mit einem p-Wert von 0,000001 statistisch hochsignifikante Unterschiede zwischen den Genpools der Kohorten und dem Genpool der Verbraucherstudie.

Damit konnte gezeigt werden, dass der globale Genpool in allen untersuchten Kohorten von der Verbraucherstudie verschieden ist.

Durch diese Art der Analyse konnte gezeigt werden, dass der globale Genpool der Verbraucherstudie an allen Markerloci am größten ist und der Genpool der untersuchten Kohorten jeweils einen Teil des Genpools der Verbraucherstudie darstellt. Nur 212 Beobachtungen der insgesamt 4070 ausgezählten Allele in den 11

Kohorten an 11 Markerloci wurden für Allele gemacht, die nicht auch Teil der Verbraucherstudie waren, dieses entspricht einem Anteil von 5,2 %.

3.3.3 Statistische Signifikanz der Allelbeobachtungszahlen, die nicht Teil der Verbraucherstudie waren

Im nächsten Schritt wurde anhand der Poisson-Gleichung geprüft, ob die in den Kohorten zusätzlich beobachteten Allele nur zufällig nicht in der Verbraucherstudie beobachtet wurden, oder ob es sich um statistisch signifikante, systematische Abweichungen handelt.

$$N_{\text{erw.}} = N_{\text{beob.}} \pm 2,58 \times N_{\text{beob.}}^{0,5} \text{ (99\% Konfidenzintervall)}$$

$N_{\text{erw.}}$ = erwartete Beobachtungszahl von Allelen, die nicht in der Verbraucherstudie auftreten

$N_{\text{beob.}}$ = tatsächliche Beobachtungszahl von Allelen, die nicht in der Verbraucherstudie auftreten

Dieser Test ergab, dass im Genpool der untersuchten Wildschweine, Schwäbisch-Hällischen Tiere und Hampshire Tiere statistisch signifikant Allele aufgetreten sind, die nicht Teil der Verbraucherstudie sind. Das bedeutet, dass diese Allele der Rassen im Verlauf der Züchtung der derzeitigen Mastschweinpopulation verlorengegangen sind. Auch das Vorkommen neuer Allele in den Herdlinientieren ist statistisch signifikant. Dies ist allerdings dadurch zu erklären, dass die untersuchten Hampshire Tiere einen Teil der Herdlinientiere darstellen.

Über die statistische Signifikanz des Auftretens neuer Allele in übrigen Kohorten kann aufgrund der zu geringen Stichprobengröße keine Aussage getroffen werden.

3.3.4 Allelverteilungen an Einzelmarkerloci

Auf den folgenden Seiten werden die Allelverteilungen an 12 ausgewählten Markerloci in den folgenden Kohorten als Balkendiagramme dargestellt (Abbildungen 12-23), um auffällige Befunde in den Allelverteilungen der einzelnen Kohorten zu erläutern:

- a) Verbraucherstudie
- b) Herdlinientiere
- c) Wildschweine
- d) Schwäbisch-Hällische Schweine
- e) Leicoma
- f) Pietrain (Ferkel aus den Infektionsversuchen)
- g) Hampshire (Ferkel aus den Infektionsversuchen)
- h) Deutsche Landrasse (Ferkel aus den Infektionsversuchen)

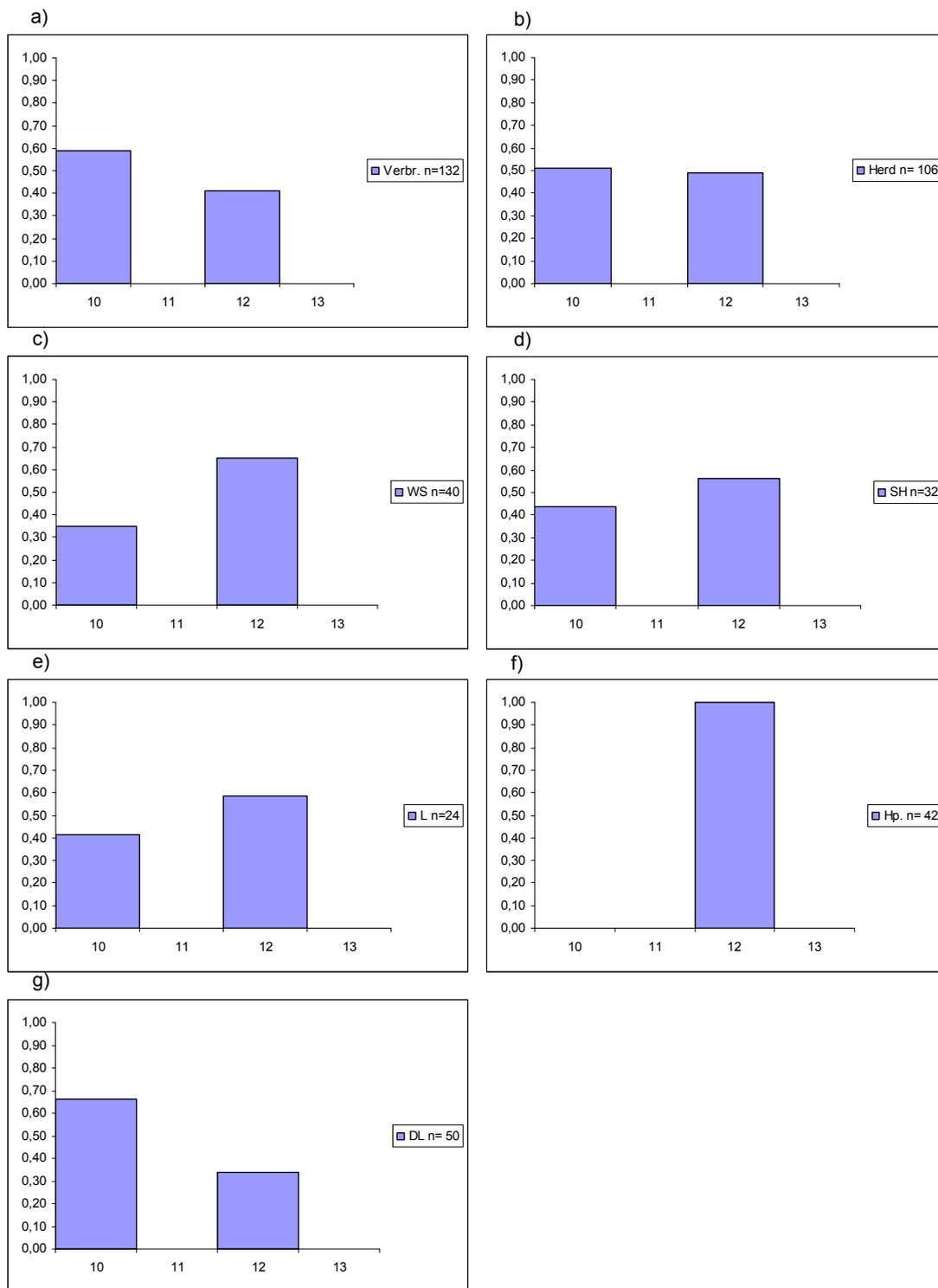


Abbildung 12: Allelverteilungen des Markers für Tyk2

Markermotiv: (ttgt)₇; PIC-Wert: 0,39; Güteklasse: A

In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeatereinheiten unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind. a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Hp.: Hampshire; g) DL: Deutsche Landrasse

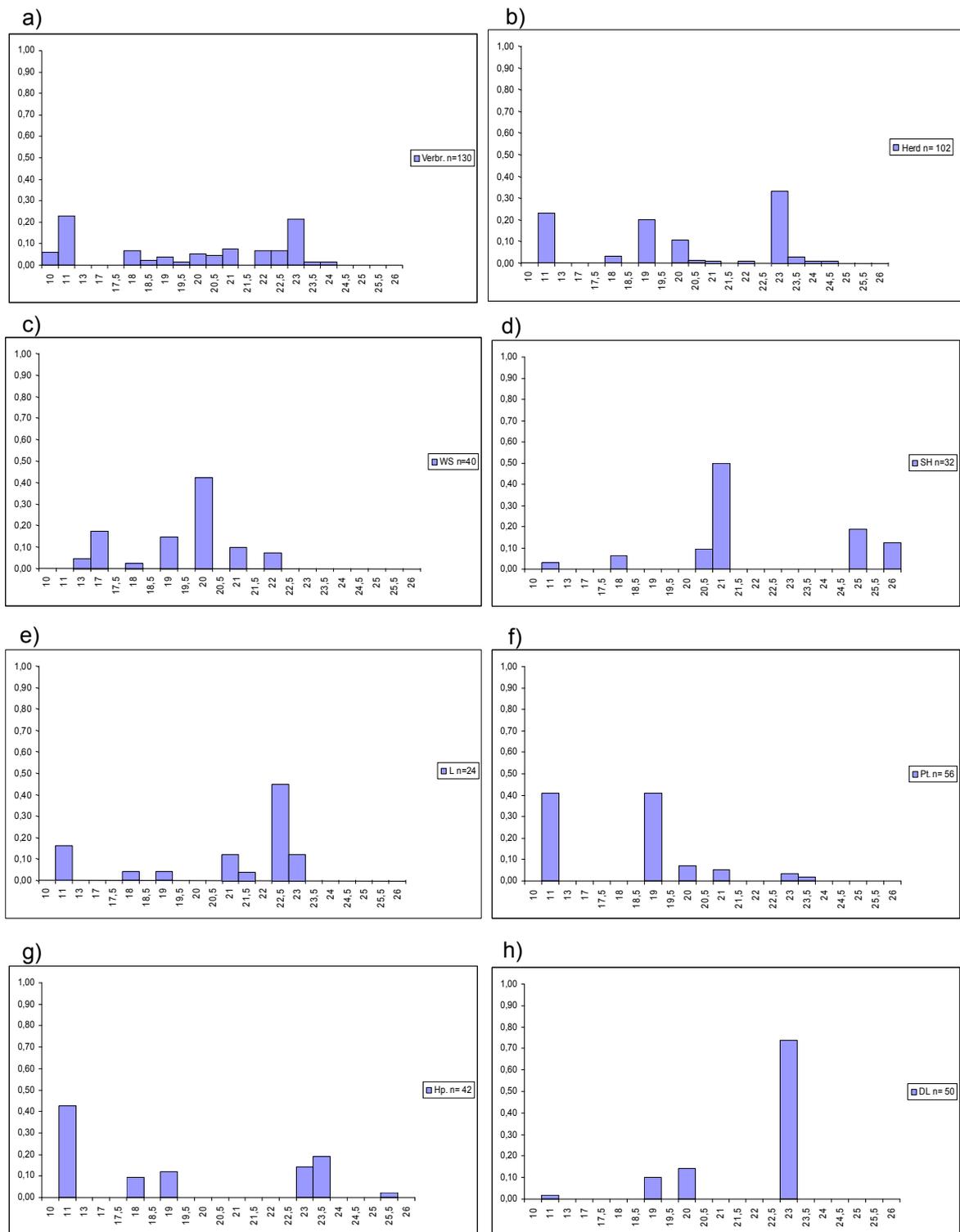


Abbildung 13: Allelverteilungen des Markers für CD95
 Markermotiv: (aaag)₂₂; PIC-Wert: 0,85; Güteklasse: B
 In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an. Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeats unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.
 a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

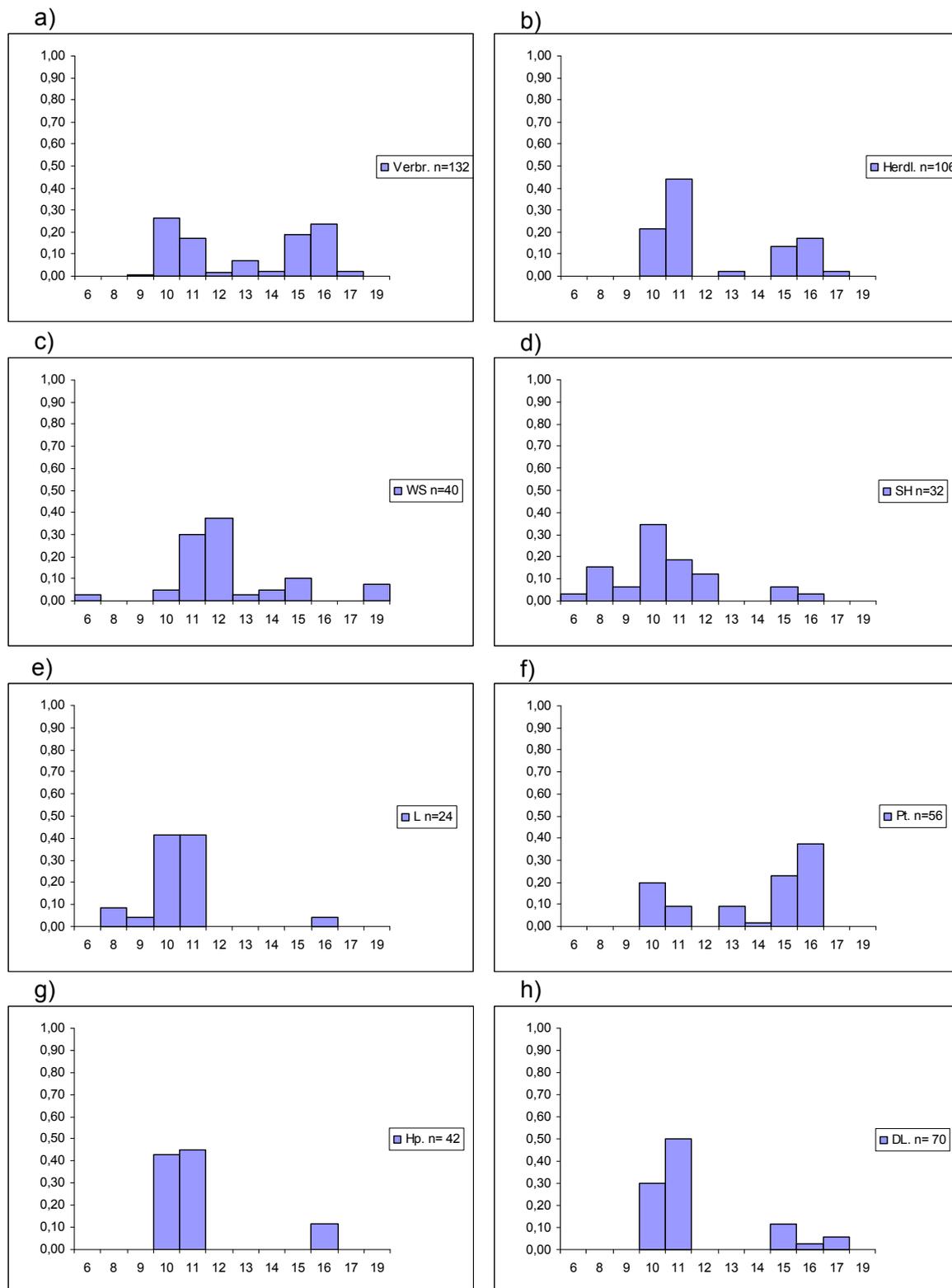


Abbildung 14: Allelverteilungen des Markers für Transferrin

Markermotiv: $(gt)_{18}$ PIC-Wert: 0,79; Güteklasse: B

In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeats unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.

a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herdl.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

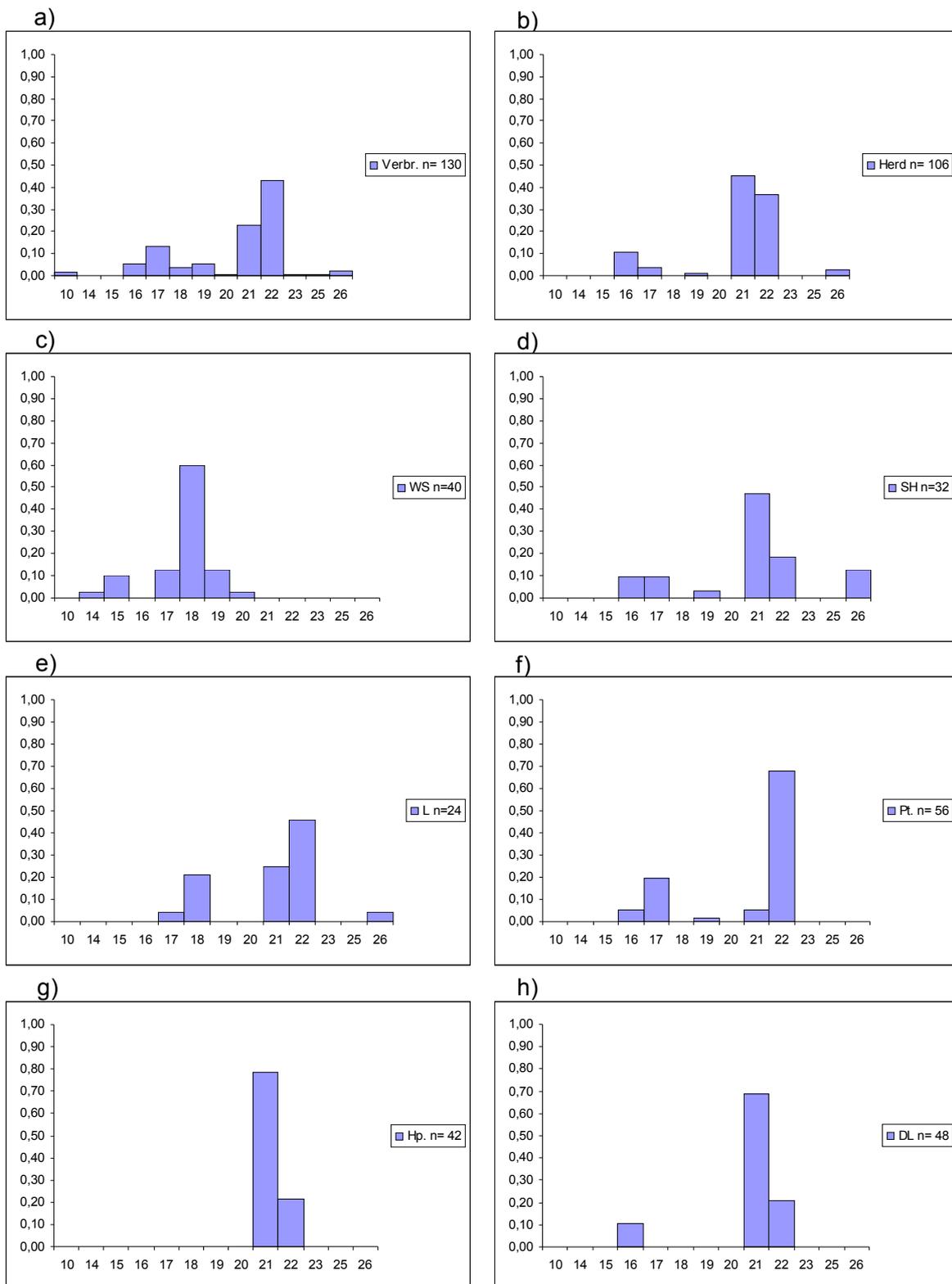


Abbildung 15: Allelverteilungen des Markers für Transferrinrezeptor 2

Markermotiv: (aaag)₁₇ PIC-Wert: 0,82; Güteklasse: A

In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeats unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.

a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

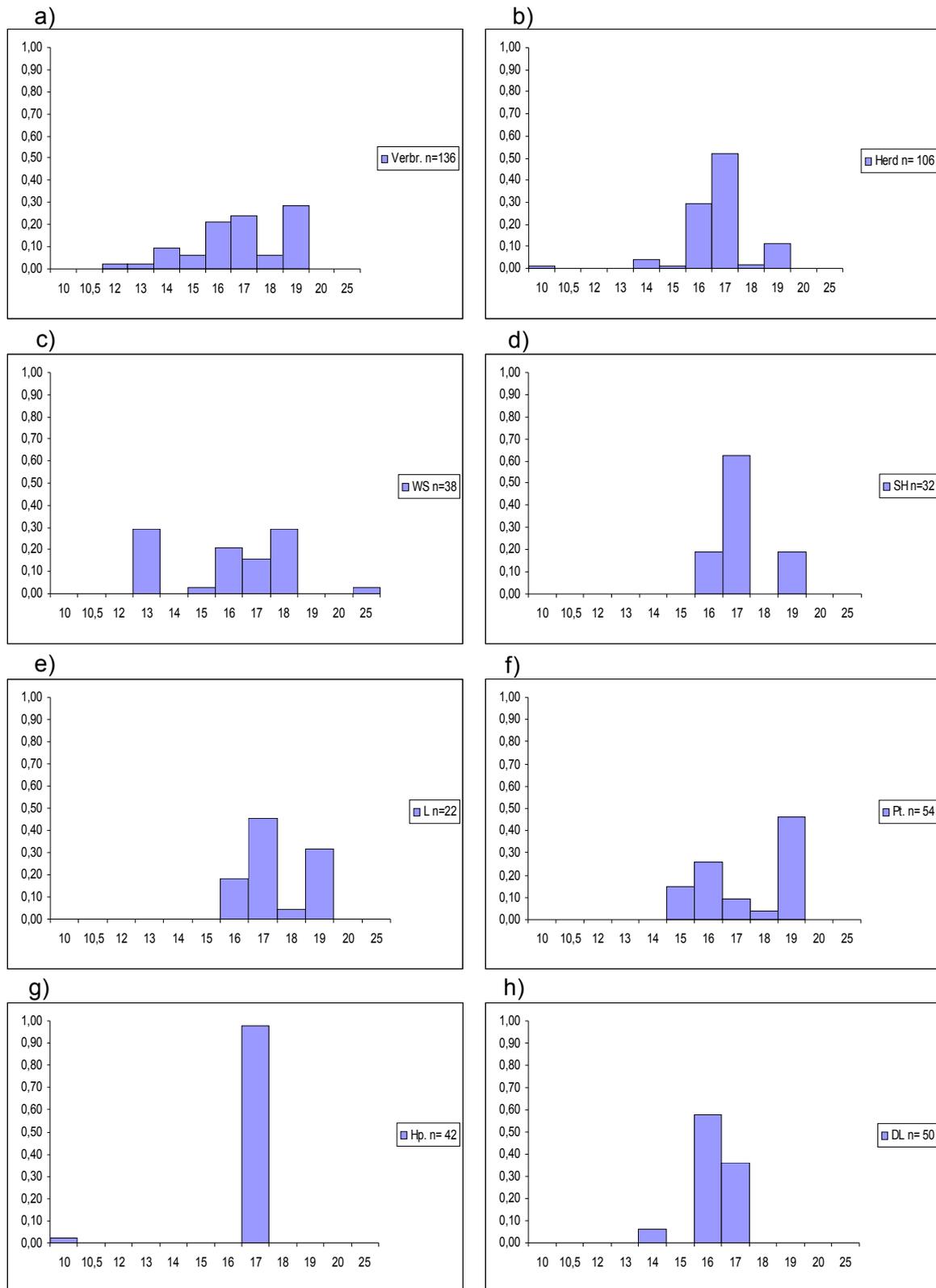


Abbildung 16: Allelverteilungen des Markers für TLR4

Markermotiv: (ataa)₁₂ PIC-Wert: 0,78; Güteklasse: A

In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeats unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.

a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

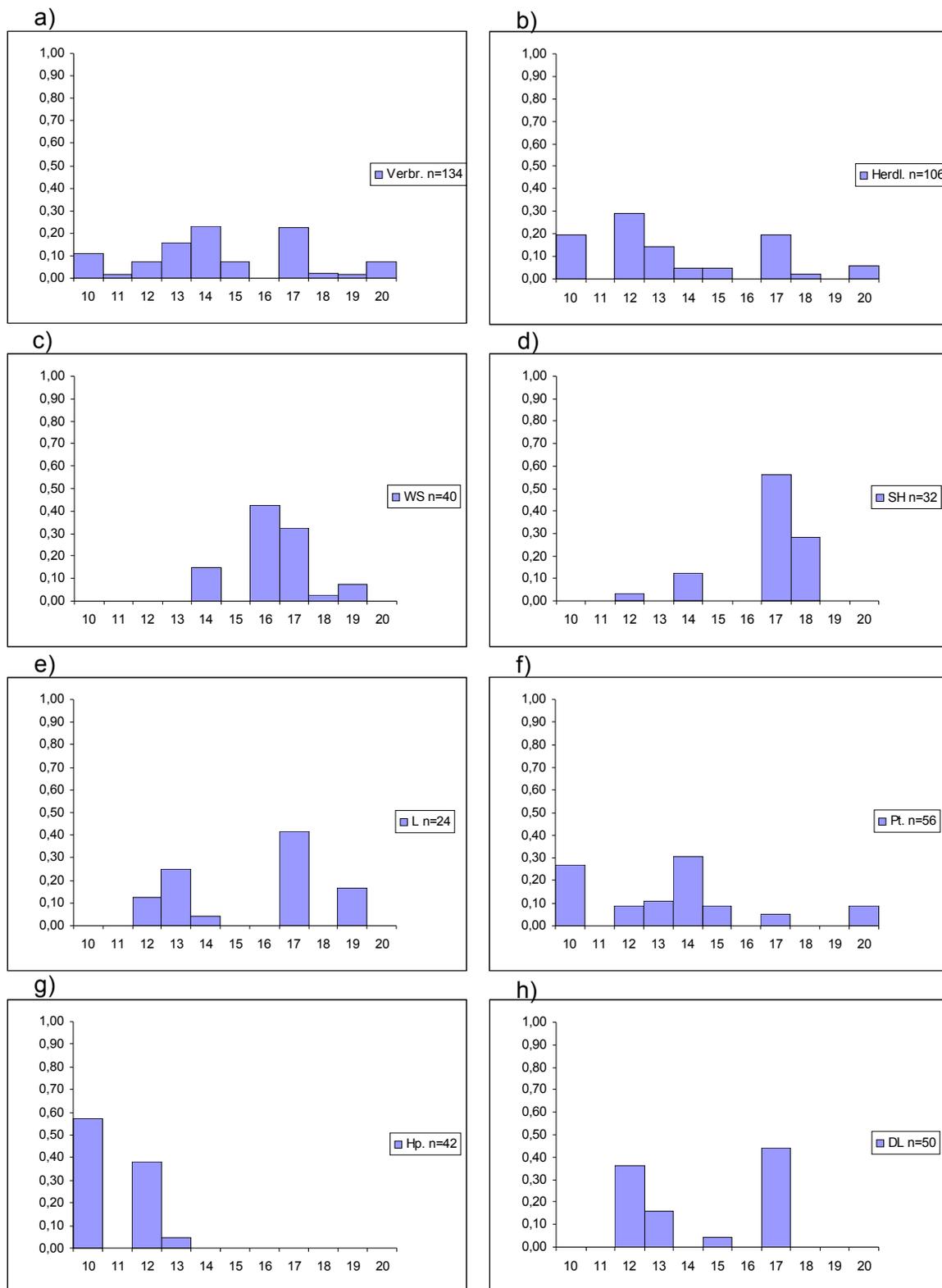


Abbildung 17: Allelverteilungen des Markers für IFNGR1

Markermotiv: (aaga)₁₃ PIC-Wert: 0,73; Güteklasse: A

In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeats unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.

a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herdl.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

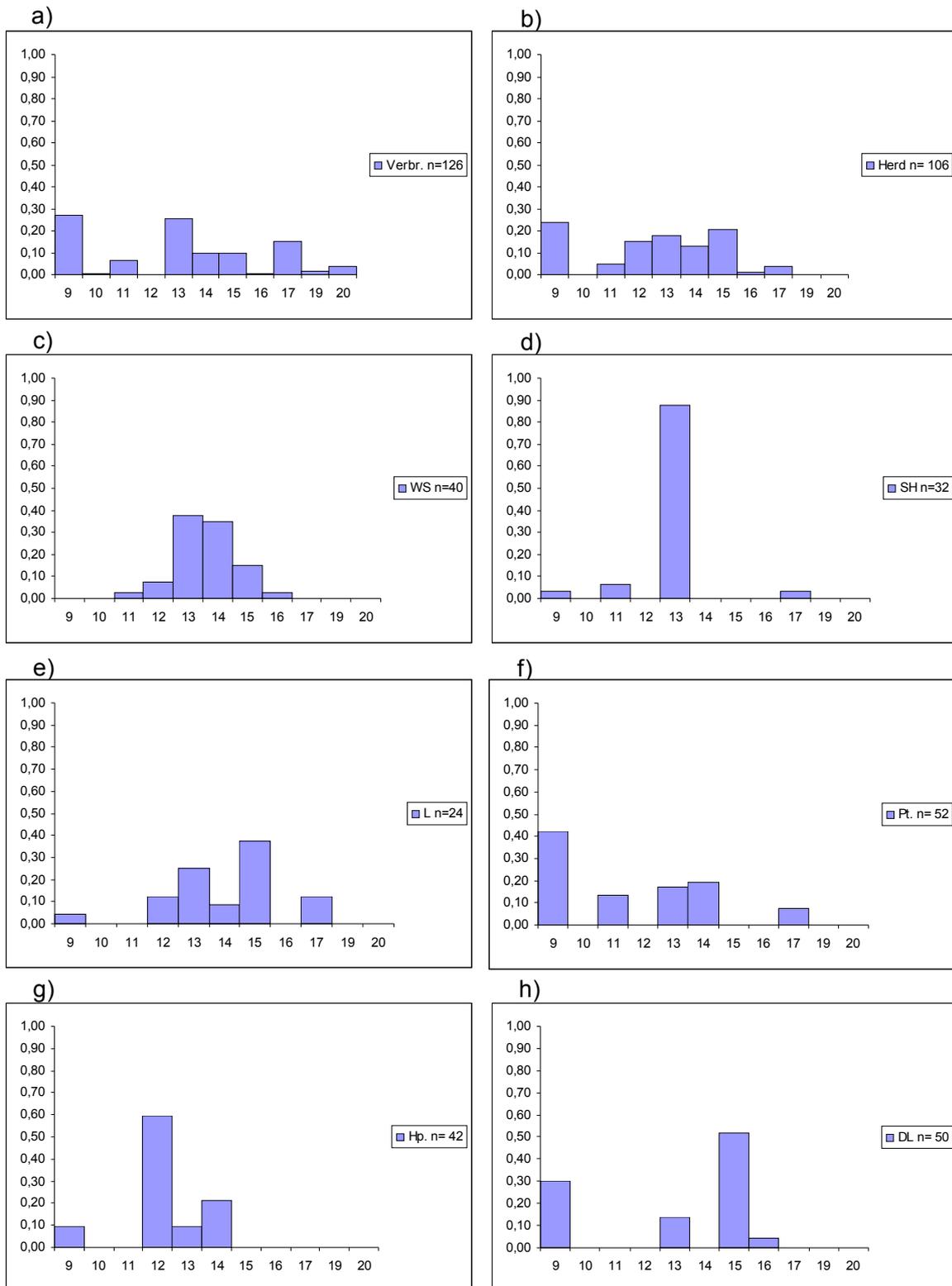


Abbildung 18: Allelverteilungen des Markers für IFNAR1 und IFNGR2

Markermotiv: (atag)₁₃+ (agac)₇ PIC-Wert: 0,72; Güteklasse: A

In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeatereinheiten unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.

a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

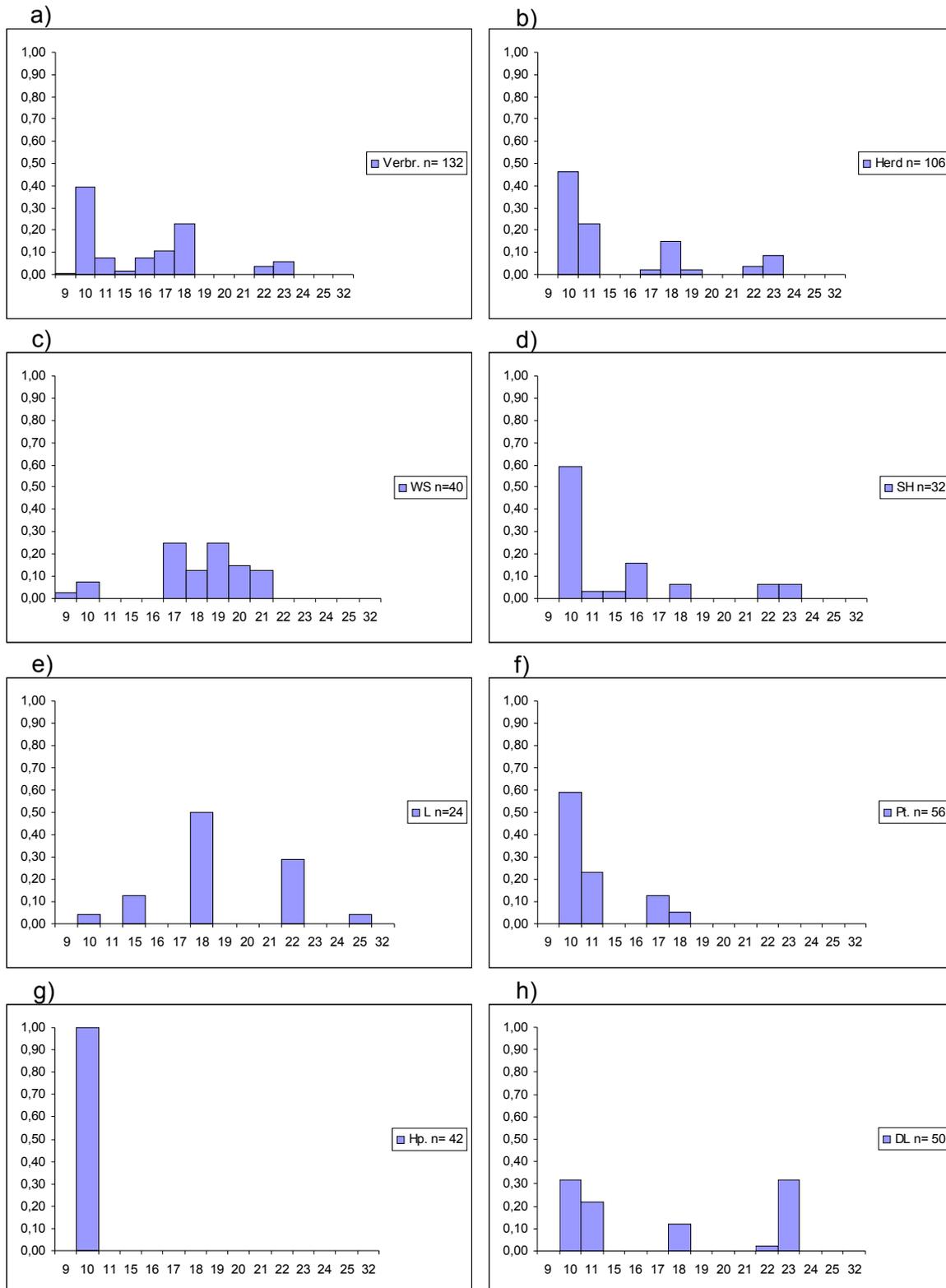


Abbildung 19: Allelverteilungen des Markers für CXCR2

Markermotiv: $(ca)_{23}$ PIC-Wert: 0,59; Güteklasse: A

In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeats unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.

a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

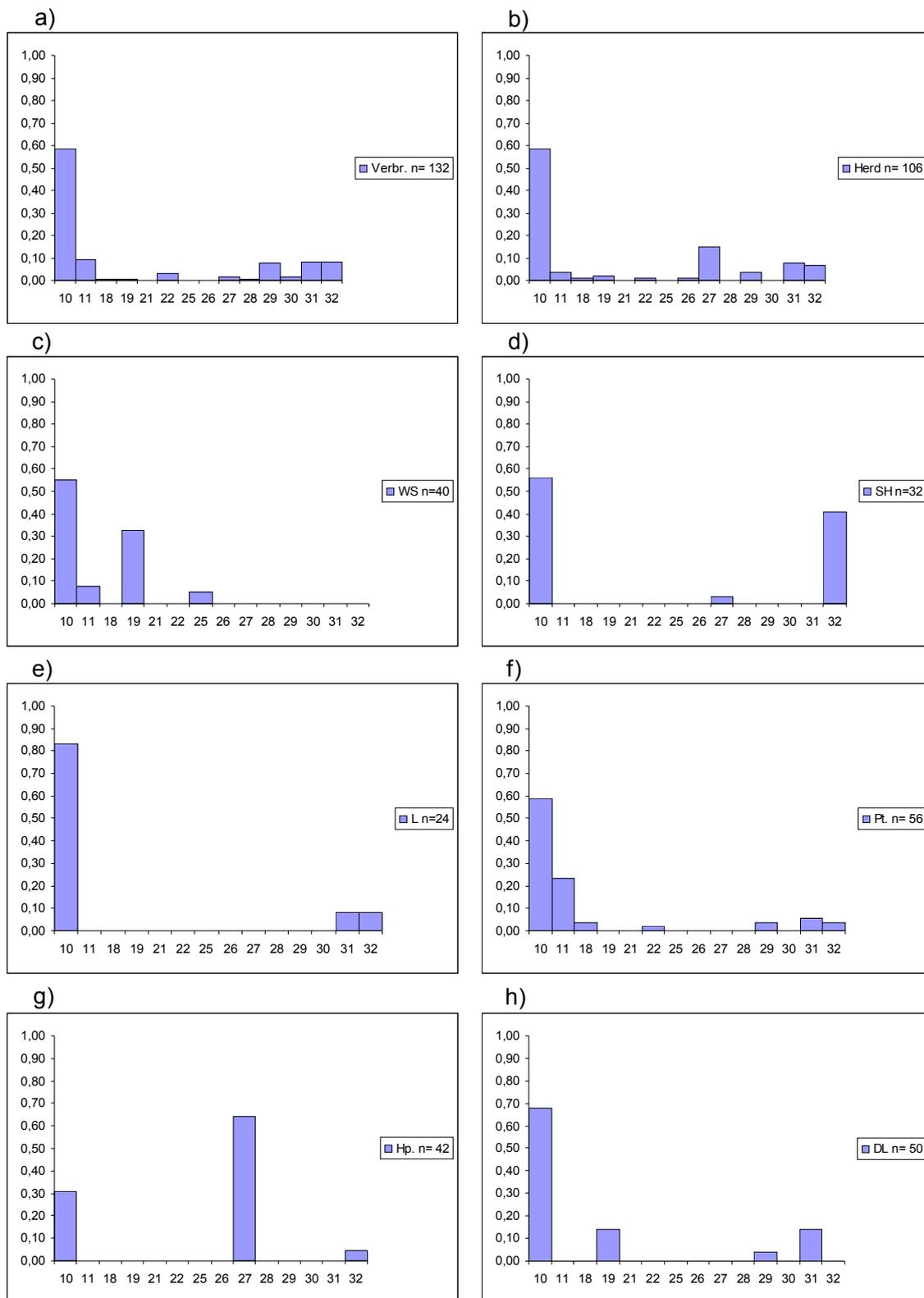


Abbildung 20: Allelverteilungen des Markers für TNFRSF11B

Markermotiv: (ac)₂₁ PIC-Wert: 0,66; Güteklasse: A

In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeatereinheiten unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.

a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

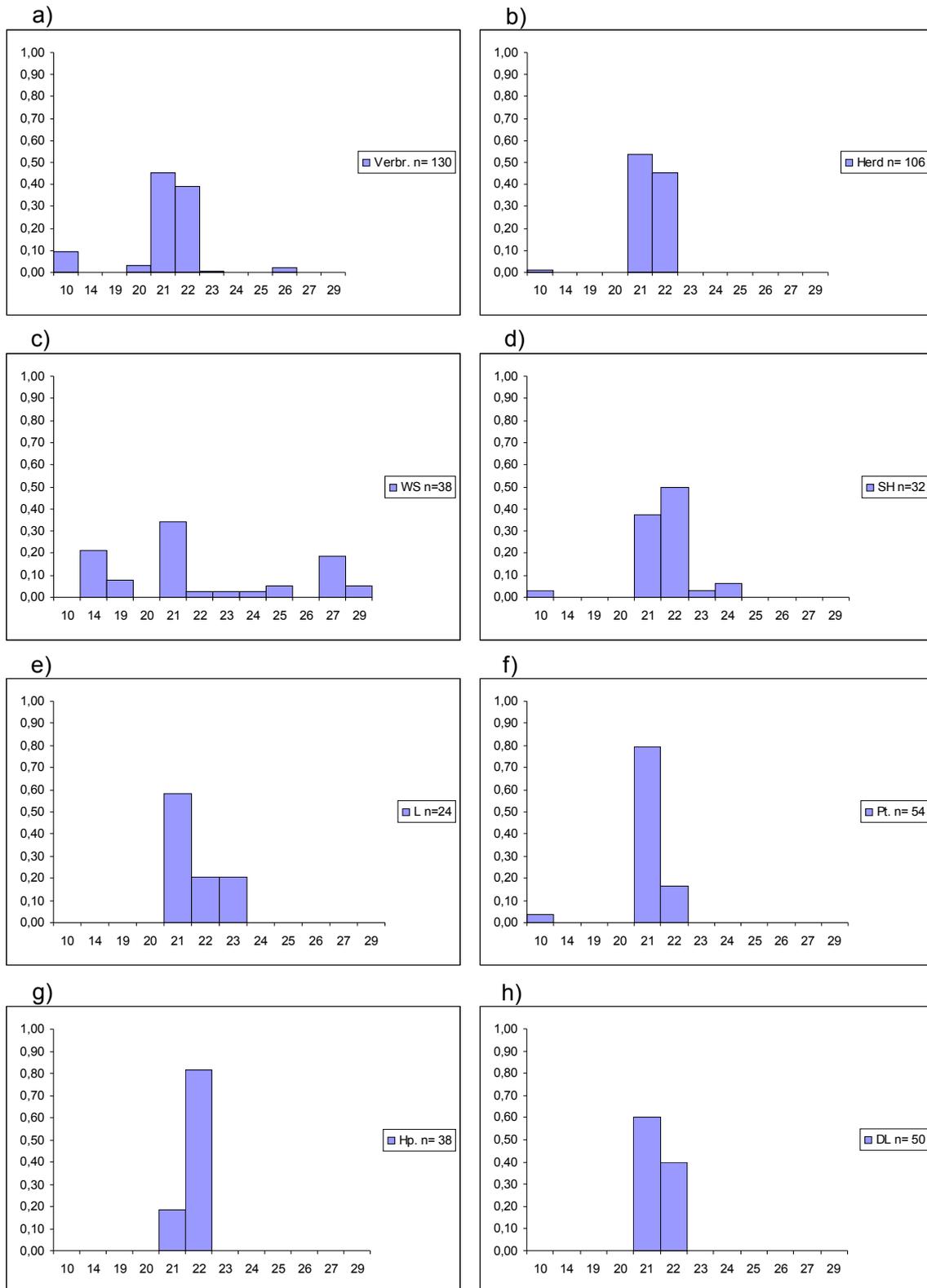


Abbildung 21: Allelverteilungen des Markers für TNFRSF12A

Markermotiv: (ca)₁₉ PIC-Wert: 0,55; Güteklasse: A

In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeats unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.

a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

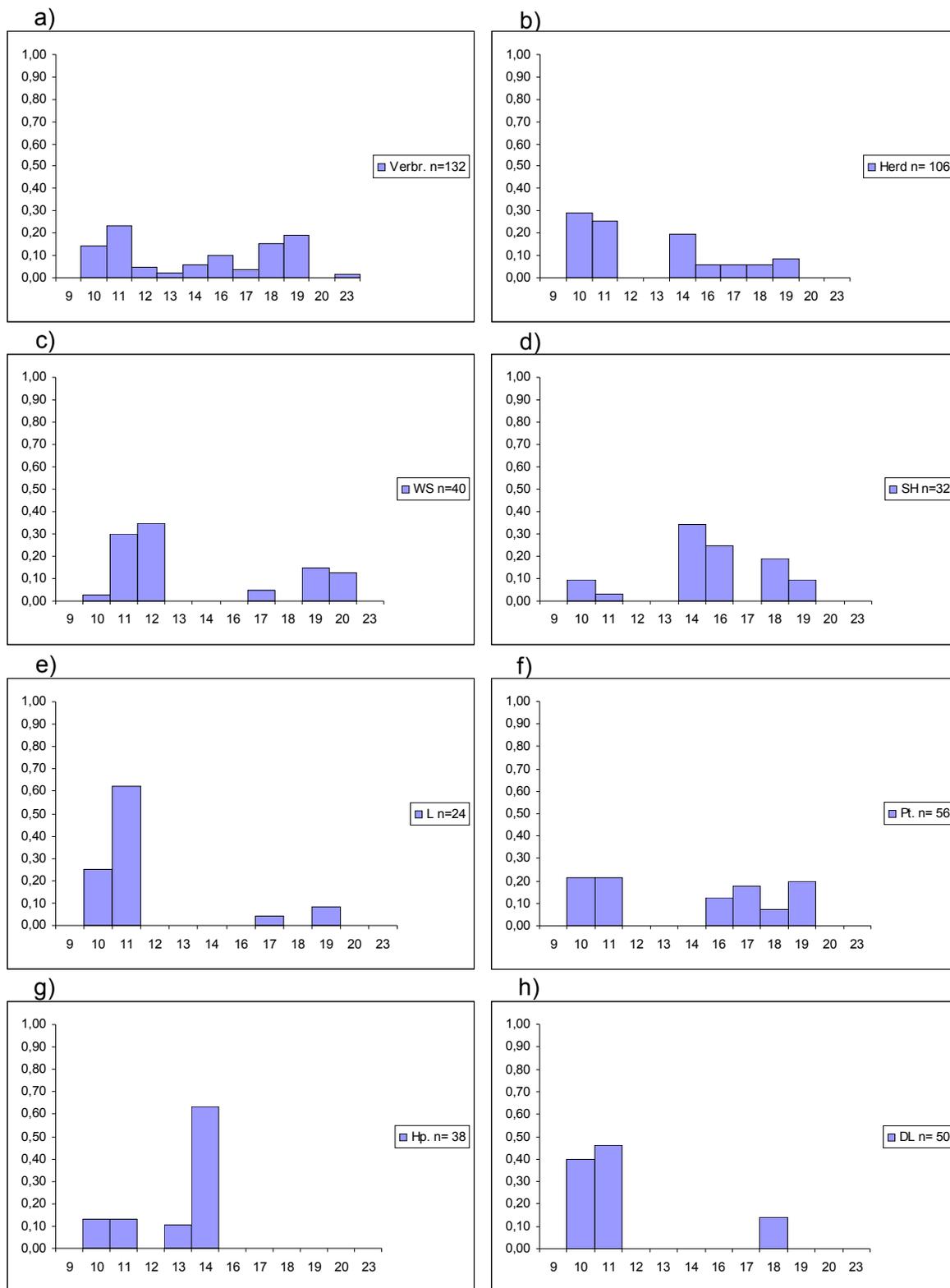


Abbildung 22: Allelverteilungen des Markers für TNF α und β
 Markermotiv: (ctg)₂₀ PIC-Wert: 0,81; Güteklasse: A
 In den Unterfiguren a) –g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.
 Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeats unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.
 a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

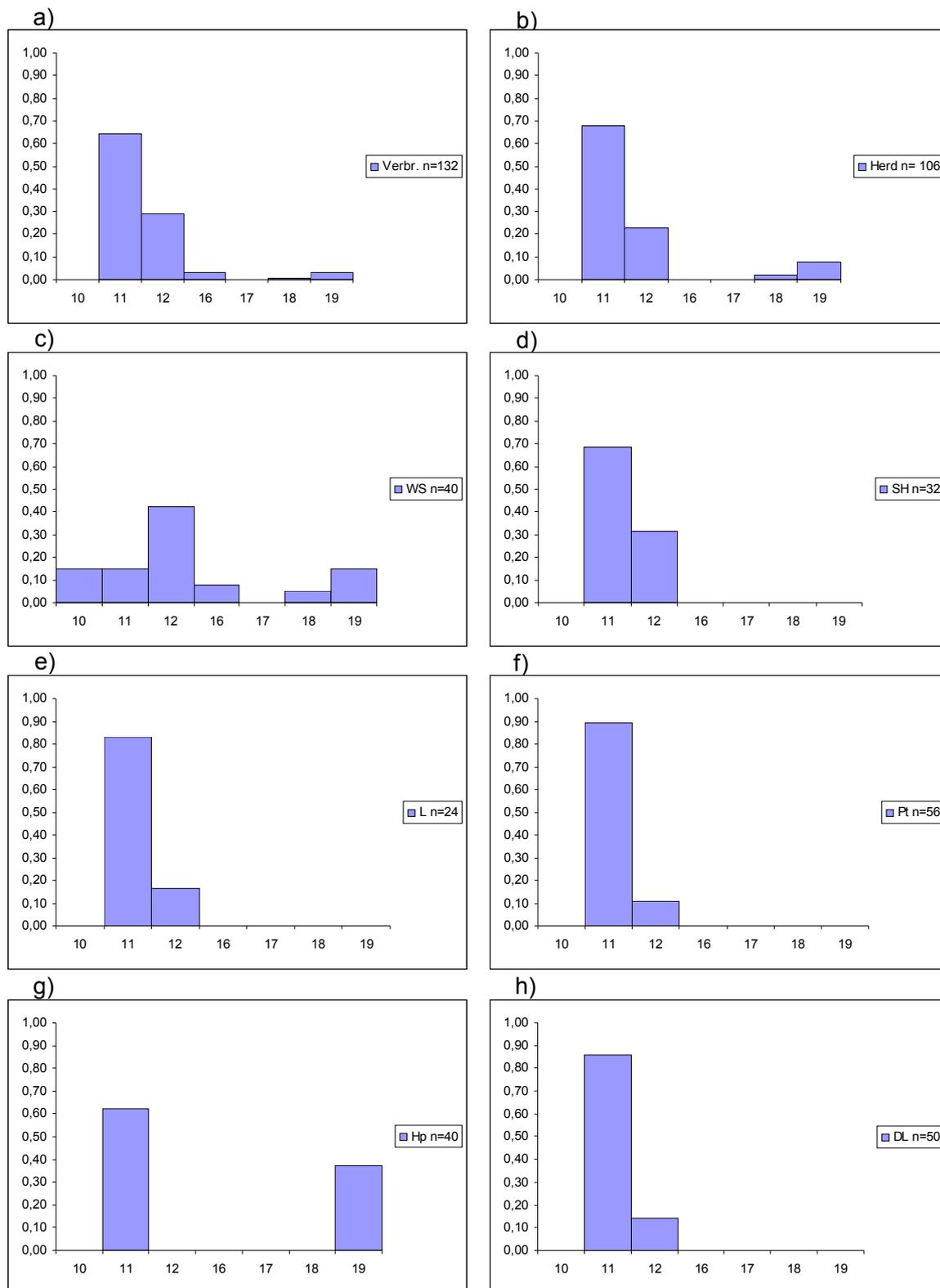


Abbildung 23: Allelverteilungen des Markers für NRAMP1

Markermotiv: (ca)₂₀ PIC-Wert: 0,36; Güteklasse: A

In den Unterfiguren a)–g) ist die Allelverteilung des Markers in den jeweiligen Kohorten dargestellt. „n“ gibt jeweils die Gesamtzahl der für die dargestellte Kohorte typisierten Allele an.

Die Zahlen auf der X-Achse betiteln die aufgetretenen Allele, die sich jeweils in der Anzahl ihrer Repeatereinheiten unterscheiden. Auf der Y-Achse ist abzulesen, mit welcher Frequenz die Allele in der gezeigten Kohorte aufgetreten sind.

a) Verbr.: Verbraucherstudie; b) Herd.: Herdlinientiere; c) WS: Wildschweine; d) SH: Schwäbisch-Hällische Schweine; e) L: Leicoma; f) Pt.: Pietrain; g) Hp.: Hampshire; h) DL: Deutsche Landrasse

3.3.5 Diskussion der Allelverteilungen in den Kohorten an 12 Markerloci anhand der Balkendiagramme

In den folgenden Kapiteln 3.3.5.1-3-3-5-4 werden die auffälligsten Befunde der in den Abbildungen 12-23 dargestellten Allelverteilungen erörtert.

Die Allelverteilungen in den Kohorten an dem Markerlocus für Tyk2 werden nicht in die Diskussion einbezogen, da in allen Kohorten bis auf die Hampshire Tiere immer dieselben zwei Allele aufgetreten sind und der Marker somit nicht informativ ist. Bei den Hampshire Tieren wurde nur eins der zwei Allele beobachtet.

3.3.5.1 Gemischte Kohorten

In den folgenden zwei Unterkapiteln werden die Allelverteilungen in den beiden Mischkohorten der Verbraucherstudie und der Herdlinientiere erörtert.

3.3.5.1.1 Die Verbraucherstudie als Referenzkohorte

Bei dem Vergleich der Allelverteilungen der 8 verschiedenen Kohorten an allen 12 untersuchten Markerloci ist zu erkennen, dass die Allelvielfalt in den Proben der Verbraucherstudie an 9 von 11 Markerloci am größten war. Die Anzahl an unterschiedlichen Allelen in dieser Kohorte lag zwischen 5 (für den Marker für NRAMP1) und 14 (für den Marker für CD95), während die Zahl der identifizierten Allele für alle Marker in den übrigen Kohorten nur zwischen 2 und 11 lag. Bei Einzelbetrachtung jedes Locus war die Anzahl der Allele in der Verbraucherstudie bei 9 von 11 Markern höher als in den übrigen 7 betrachteten Kohorten. Lediglich an den Markerloci für TNFRSF12A und NRAMP1 wurden in der Wildschweinkohorte mehr unterschiedliche Allele identifiziert als in der Verbraucherstudie. Bei den Wildschweinen konnten 9 bzw. 6 Allele identifiziert werden, während in den Proben der Verbraucherstudie nur 6 bzw. 5 Allele gefunden wurden.

Diese Diversität ist dadurch zu erklären, dass die Verbraucherstudienkohorte sowohl Proben unterschiedlicher deutscher Mastschweinbetriebe (Fleischproben aus Supermärkten deutschlandweit) als auch Proben lokaler Landwirte (Fleischproben aus örtlichen Schlachtereien deutschlandweit) umfasst und deshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich um unverwandte Tiere verschiedener

Rassen bzw. gezüchteter Hybridschweine handelt. Der Genpool dieser Kohorte setzt sich folglich aus dem Genpool einer unbekannt Anzahl verschiedener Rassen zusammen, und somit geben die Allelverteilungen an den 12 betrachteten Loci einen repräsentativen Überblick über den Genpool an 12 potentiellen Resistenzloci in der rezenten Mastschweinpopulation. In Kapitel 3.3.1 konnte bereits mit Hilfe eines Heterozygotietestes statistisch belegt werden, dass es sich bei der Verbraucherstudienkohorte tatsächlich um eine Outbred-Population handelt, die für nachfolgende Analysen als Referenzkohorte herangezogen werden kann.

3.3.5.1.2 Genpool der Herdlinientiere der BHZP

Bei den genotypisierten Herdlinientieren der BHZP handelt es sich um Tiere der Rassen Hampshire, Pietrain, Deutsche Landrasse und um Kreuzungstier der Deutschen Landrasse mit Deutschem Edelschwein (Large White). Für fünf Proben liegen keine Rasseinformationen vor. Untersucht wurden 42 Sauen und 11 Eber, wobei 29 Sauen und 7 Eber gleichzeitig Elterntiere einiger der untersuchten Hampshire, Pietrain und Deutsche Landrasse Tiere waren.

Daraus folgt, dass die in den Kohorten der Hampshire, Pietrain und Deutsche Landrasse Tiere beobachteten Allele sich auch im Genpool der Herdlinientiere der BHZP wiederfinden sollten.

Tatsächlich wird diese Hypothese durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt.

An allen 12 betrachteten Markerloci finden sich bis auf wenige Ausnahmen alle Allele der Hampshire, Pietrain und Deutsche Landrasse Tiere in den Herdlinientieren wieder. Allele, die in den Hampshire, Pietrain und Deutsche Landrasse Tiere aufgetreten sind, aber nicht in den Herdlinientieren zu finden sind, stammen von den zugehörigen Elterntieren, die zwar typisiert wurden (siehe Tabelle 24 im Anhang), aber nicht gleichzeitig Bestandteil der untersuchten Herdlinientiere waren.

Die Allele, die nur in der Herdlinienkohorte aufgetreten sind, stammen vermutlich entweder aus den Kreuzungstieren Deutsche Landrasse mit Deutschem Edelschwein oder von den Tieren, die keine Elterntiere zu den Hampshire, Pietrain und Deutsche Landrasse Kohorten waren.

Obwohl sich die Herdlinienkohorte aus verschiedenen Rassen zusammensetzt, wurden an keinem Markerlocus so viele verschiedene Allele beobachtet wie in der

Verbraucherstudie. Dies erklärt sich dadurch, dass die Herdlinientiere nur von einer Züchtungsorganisation stammen und die Diversität des Genpools der Tiere als Folge von Inzuchtverfahren bei der Mastschweinzucht kleiner geworden ist.

An 8 von 11 betrachteten Loci stellt der Genpool der Zuchttiere der BHZP einen Teil des gesamten Genpools der derzeitigen Mastschweine (Verbraucherstudie) dar.

Lediglich an den Loci für IFNAR1/IFNGR2, TLR4 und CD95 wurde jeweils ein Allel in den Herdlinientieren beobachtet, das nicht in der Verbraucherstudie aufgetreten ist.

Diese Allele gehen alle auf die untersuchten Hampshire Tiere zurück, wie bereits bei der Analyse des globalen Genpools über alle Loci gezeigt werden konnte (siehe 3.3.2).

Dies ist dadurch zu erklären, dass nur wenige Mastschweinzuchtbetriebe in Deutschland Hampshire Tiere für die Zucht einsetzen und der Genpool der Hampshire Tiere somit nicht in den Proben der Verbraucherstudie erfasst wurde.

3.3.5.2 Allelverteilungen der reinrassigen Mastschweintiere

Die Hampshire, Pietrain, Deutsche Landrasse und Leicoma Tiere, für die die Allelverteilungen an den 12 Markerloci dargestellt wurden, repräsentieren die für die Mastschweinzucht in Deutschland eingesetzten Rassen. Mit Hilfe dieser Rassen werden Hybridschweine erzeugt, die dann vom Endverbraucher konsumiert werden. Die Rassen Hampshire und Pietrain werden zur Erzeugung von Hybridzuchtebern eingesetzt und die Rassen Deutsche Landrasse und Leicoma dienen der Erzeugung von Muttersaulinien. Allerdings sind die Leicoma Tiere kein Bestandteil der Herdlinientiere der BHZP.

Bei Betrachtung der Allelverteilungen der reinrassigen Tiere fällt eine deutliche Reduzierung der Alleldiversität an den Markerloci im Vergleich zu der Verbraucherstudie auf.

Besondere Auffälligkeiten zeigen die Hampshire Tiere. An den Markerloci für TLR4 und CXCR2 wurde in der untersuchten Kohorte nur ein einziges Allel (abgesehen von einer Einzelbeobachtung eines weiteren Allels am TLR4 Markerlocus) beobachtet. Auch an den Loci für IFNAR1/IFNGR2, TNFRSF11B, TNF α/β und NRAMP1 zeigen die Hampshire Tiere Besonderheiten, da an diesen Loci jeweils ein

Allel besonders häufig auftritt, das in den Pietrain und Deutsche Landrasse Tieren nicht beobachtet wurde.

Wie bereits in Kapitel 3.3.3 erwähnt tragen die Hampshire Tiere außerdem Allele, die nicht in der Verbraucherstudie nicht vorkommen, und zwar an den Loci für IFNAR1/IFNGR2, TLR4 und CD95. Demnach beinhaltet der Genpool der untersuchten Hampshire Tiere der BHZP Allele, die nicht repräsentativ sind für den Genpool des derzeit verzehrten Schweinefleisches.

Im Gegensatz dazu beinhaltet der Genpool der untersuchten Pietrain und Deutsche Landrasse Tiere nur Allele, die Bestandteil der Verbraucherstudie sind.

Für die Leicoma Schweine findet sich an den Markerloci für CD95, Transferrin, IFNAR1/IFNGR2 und CXCR2 ebenfalls jeweils ein Allel, das nicht in der Verbraucherstudienkohorte auftritt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass aufgrund der zufälligen Auswahl der Kauforte der Verbraucherstudienproben keine Leicoma-Proben erfasst wurden.

Eine weitere Auffälligkeit für die Leicoma Tiere zeigt sich am Locus für TNFRSF11B, da eins von drei beobachteten Allelen über 80 % der Beobachtungen ausmacht.

Die gezeigten Allelverteilungen der Hampshire, Pietrain und Deutsche Landrasse Tiere sind allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da die Tiere teilweise verwandt sind und es somit zu einer Überrepräsentierung der aufgetretenen Allele kommt.

Von der Deutschen Landrasse wurden 25 Tiere aus 7 Familien typisiert (für den Transferrinmarker 35 Tiere aus 11 Familien), wobei die Elterntiere lediglich aus 6 verschiedenen Sauen und 5 verschiedenen Ebern bestanden (bzw. 10 Sauen und 9 Ebern), bei den Pietrain-Schweinen handelt es sich um 28 Tiere aus 18 Familien mit 13 Sauen und 13 Ebern, und bei den Hampshire-Schweinen handelt es sich um 21 Tiere aus 12 Familien mit 11 Sauen und 10 Ebern.

3.3.5.3 Allelverteilungen der Wildschweinkohorte

Wie eingangs bereits erwähnt handelt es sich bei den Wildschweinen um die Vorläufer aller heutigen Haustierrassen. Da die Domestizierung allerdings schon 9000 Jahre zurückliegt, wäre zu erwarten, dass der Genpool der derzeitigen europäischen Wildschweinpopulation unterschiedlich zu allen anderen betrachteten Kohorten ist.

Die Auswertung der Balkendiagramme stützt diese Hypothese.

Im Vergleich zu den Allelverteilungen in der Verbraucherstudie zeigt sich an 10 von 12 Markerloci eine geringere Alleldiversität als in der Verbraucherstudie. Nur an den Markerloci für TNFRSF12A und NRAMP1 finden sich mehr unterschiedliche Allele als in der Verbraucherstudie.

Neben der geringeren Diversität ist außerdem an allen Markerloci zu erkennen, dass auch die Verteilung der Allele an sich im Vergleich mit der Verbraucherstudie unterschiedlich ist. Zwar gibt es an allen Loci auch gemeinsame Allele, aber an allen Markerloci außer IFNAR1/IFNGR2 treten bei den Wildschweinen Allele auf, die weder in der Verbraucherstudie noch in den anderen untersuchten Kohorten beobachtet wurden. Daraus lässt sich folgern, dass diese Allele im Verlauf der Domestizierung verlorengegangen sind.

3.3.5.4 Schwäbisch-Hällische Schweine als Vertreter einer alten Schweinerasse

Bei den Schwäbisch-Hällischen Schweinen handelt es sich um eine Rasse, die derzeit nicht zur Mastschweinzucht eingesetzt wird.

Die Schwäbisch-Hällischen Schweine galten in den 1980iger Jahren bereits als ausgestorben, bis einige wenige Landwirte 1984 mit nur 7 Sauen und einem Eber eine neue Zucht begannen. Heute werden die Tiere wieder von über 1000 Landwirten in Deutschland gezüchtet. Da aber alle heutigen Tiere nur auf einen so geringen Bestand zurückgehen, wäre zu erwarten, dass die Diversität des Genpool an den Markerloci innerhalb dieser Rasse entsprechend gering ist und außerdem

auch Allele auftreten, die in den Mastschweinkohorten bzw. der Verbraucherstudie nicht beobachtet wurden.

Die Auswertung der Daten zeigt, dass die Alleldiversität in den Schwäbisch-Hällischen Schweinen an allen Markerloci geringer ist als in der Verbraucherstudie. An den Markerloci für CD95, Transferrin und TNFRSF12A finden sich Allele, die nicht auch in der Verbraucherstudie auftreten.

In Kapitel 3.3.3 konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Auftreten anderer Allele eine statistisch signifikante Abweichung vom Genpool der Verbraucherstudie darstellt.

Besondere Auffälligkeiten zeigen sich außerdem an den Loci für CD95, TLR4, IFNAR1/IFNGR2, IFNGR1 und TNFRSF11B, da an diesen Loci jeweils ein Allel überrepräsentiert ist, das in der Verbraucherstudie selten beobachtet wurde.

Der Grad der Allelverarmung ist mit dem der anderen reinrassigen Kohorten vergleichbar.

3.3.5.5 Einzelvergleich der Allelverteilungen in großen Kohorten an den untersuchten Loci mit der Verbraucherstudienkohorte

Der globale Vergleich zwischen den Genpools der Kohorten und dem Genpool der Verbraucherstudie (Kapitel 3.3.2) hatte für alle Vergleiche hochsignifikante Unterschiede ergeben. An dieser Stelle soll nun gezeigt werden, an welchen Loci dieser Unterschied besonders ausgeprägt ist.

Insgesamt wurden 84 paarweise Vergleiche durchgeführt, wobei die Proben der Verbraucherstudie als Referenzkohorte dienten. Der Tabelle 11 sind die jeweiligen p-Werte zu entnehmen, die mit dem T1 Algorithmus der Clump-Software auf Basis von 100.000 Simulationen berechnet wurden.

Die nachfolgende Abbildung 24 zeigt eine grafische Darstellung der Ergebnisse.

Tabelle 11: Paarweiser Einzellokusvergleich der Allelverteilungen zwischen den Schweinekohorten und der Verbraucherstudie als Referenzpopulation

Gen / Markername	p-Wert aus T1 für Vergleich						
	VS – Herd.	VS - WS	VS - L	VS - SH	VS – Pt.	VS – Hp.	VS - DL
Tyk2 MS 2	0,239018	0,010530	0,123209	0,162838	-	0,00001	1,0000
CD95 MS 5	0,00001	0,00001	0,00083	0,00001	0,00001	0,00001	0,00213
Transferrin MS 1	0,0004	0,00001	0,00086	0,00001	0,172108	0,00061	0,00164
TFR2 MS 1	0,00013	0,00001	0,185228	0,03978	0,072059	0,00012	0,067419
TLR4 MS 1	0,00001	0,00001	0,337637	0,00488	0,004970	0,00001	0,02637
IFNGR1 MS 3	0,00001	0,00001	0,00185	0,00001	0,343577	0,00001	0,03493
IFNAR1/IFNGR2 MS 2	0,00001	0,00001	0,00033	0,00001	0,04108	0,00001	0,00062
CXCR2 MS 1	0,00003	0,00001	0,00001	0,112659	0,02016	0,00001	0,02065
TNFRSF11B MS 3	0,00408	0,00001	0,600454	0,00152	0,526575	0,00001	0,02609
TNFRSF12A MS 6n	0,00306	0,00001	0,00033	0,04719	0,01856	0,00325	0,339987
TNF α / β MS 1	0,00002	0,00001	0,00963	0,00016	0,00680	0,00001	0,01049
NRAMP1 MS 1	0,117459	0,00001	0,433306	0,718223	0,03030	0,00001	0,364356

Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen ergeben sich folgende p-Werte als signifikant:

Korrektur für 7 Tests: $p < 0,0073$ (7 Populationen)

Korrektur für 12 Tests: $p < 0,0042$ (12 Marker)

Korrektur für 84 Tests: $p < 0,00061$ (7 Populationen x 12 Marker)

Die Beurteilung der Signifikanz erfolgte für den p-Wert nach Korrektur für 7 Tests.

VS: Verbraucherstudie

WS: Wildschwein

L: Leicoma

H: Schwäbisch-Hällische Schweine

Herd.: Herdlinientiere der BHZP

Pt.: Pietrain

Hp.: Hampshire

DL: Deutsche Landrasse

Bei Pt., Hp. und DL handelt es sich um die Eltern der Ferkel aus den Infektionsversuchen.

Rot markiert sind die p-Werte der Vergleiche, die keine signifikanten Unterschiede aufwiesen bei Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur für 7 Tests (7 Marker jeweils gegen Verbraucherstudie)

Die p-Werte aus den Algorithmen T2, T3 und T4 sind der Tabelle 25 im Anhang zu entnehmen

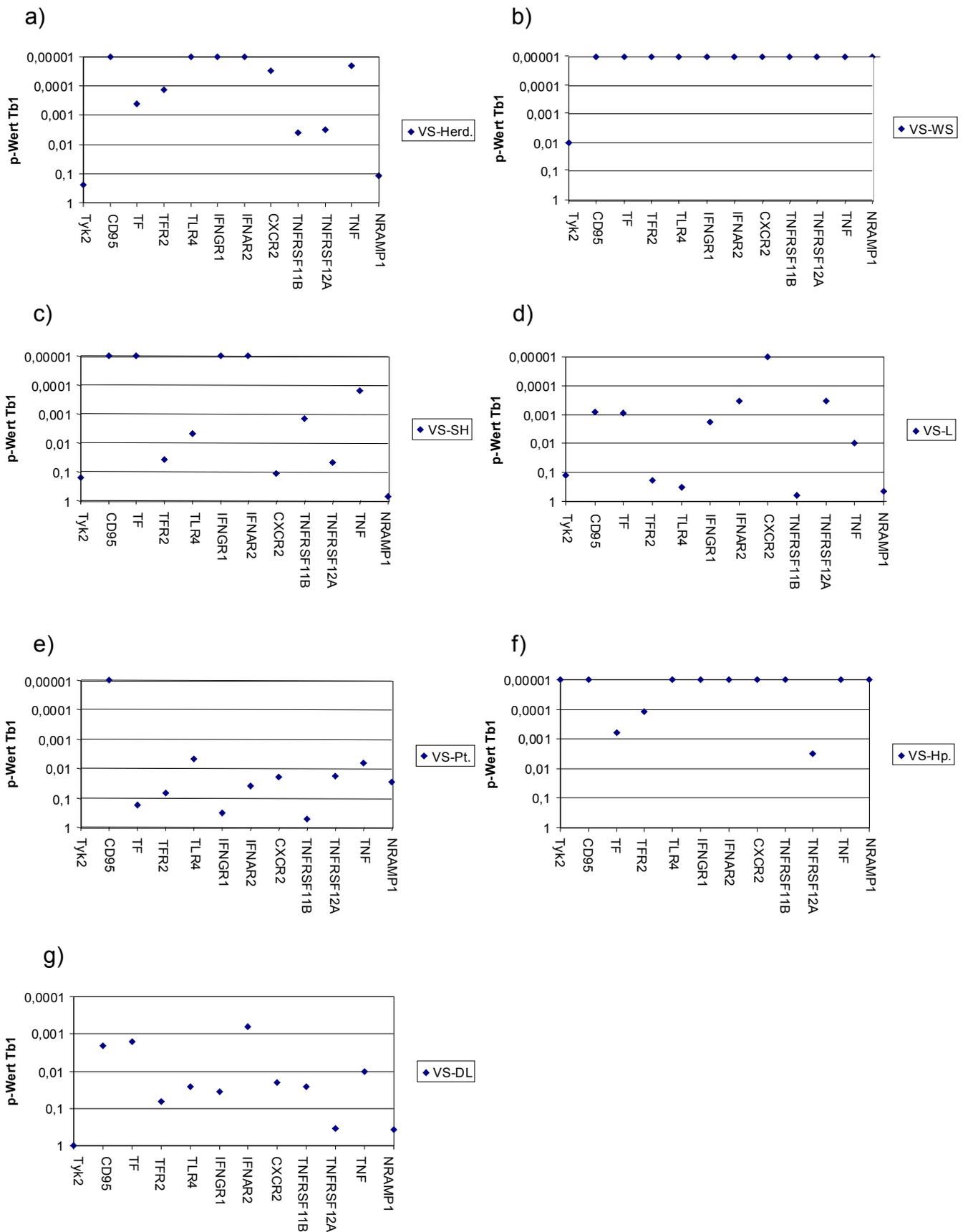


Abbildung 24: Grafische Darstellung der Signifikanzniveaus an 12 Markerloci für 7 Vergleiche. Auf den X-Achsen sind allen Teilabbildungen a)-g) jeweils die betrachteten Markerloci dargestellt. Auf den Y-Achsen sind die zugehörigen p-Werte aus dem T1 Algorithmus für den jeweiligen Vergleich abzulesen. a) VS-Herd.: Vergleich der Allelverteilungen in der Verbraucherstudie und der Herdlinientiere

- b) VS-WS.: Vergleich der Allelverteilungen in der Verbraucherstudie und den Wildschweinen
- c) VS-SH: Vergleich der Allelverteilungen in der Verbraucherstudie und den Schwäbisch-Hällischen Schweinen
- d) VS-L: Vergleich der Allelverteilungen in der Verbraucherstudie und den Leicoma Schweinen
- e) VS-Pt.: Vergleich der Allelverteilungen in der Verbraucherstudie und den Eltern der Pietrain-Ferkeln aus den Infektionsversuchen
- f) VS-Hp.: Vergleich der Allelverteilungen in der Verbraucherstudie und den Eltern der Hampshire-Ferkeln aus den Infektionsversuchen
- g) VS-DL.: Vergleich der Allelverteilungen in der Verbraucherstudie und den Eltern der Deutsche Landrasse-Ferkeln aus den Infektionsversuchen

Die Marker für Tyk2 und NRAMP1 haben mit PIC-Werten von 0,39 und 0,36 nur einen geringen Informationsgehalt, so dass die Clump-Ergebnisse als nicht aussagekräftig eingestuft werden.

Die Tatsache, dass die Vergleiche der Allelverteilungen in den Kohorten mit der Verbraucherstudie an diesen beiden Markerloci in den meisten Fällen keine signifikanten Unterschiede zeigt, ist wahrscheinlich auf die Beschaffenheit der Marker zurückzuführen und lässt nicht auf eine biologische Bedeutung schließen.

Die Allelverteilungen in der Wildschweinkohorte und den Hampshire Tieren wiesen allerdings trotz der geringen Informativität der Marker Unterschiede auf.

In der Wildschweinkohorte wurden am NRAMP1 Locus drei Allele beobachtet, die sonst in keiner Kohorte aufgetreten sind und bei den Hampshire Tieren wurde ein seltenes Allel auffällig häufig beobachtet.

Alle untersuchten Hampshire Tiere sind am Tyk2 Locus homozygot für ein Allel und auch in der Wildschweinkohorte wurde dieses Allel häufiger beobachtet als in der Verbraucherstudie.

Bei den übrigen untersuchten 10 Loci handelt es sich um hochinformativ Marker mit PIC-Werten zwischen 0,55 und 0,85, so dass diese Marker als gleichwertig betrachtet werden können.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Allelverteilung in den Herdlinientieren, den Wildschweinen und den untersuchten Hampshire Tieren an allen 10 Loci auch unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur für 84 Tests hochsignifikant von der Verteilung in der Verbraucherstudie unterscheiden. Das Ergebnis der Herdlinientiere ist darauf zurückzuführen, dass die untersuchten Hampshire Tiere Bestandteil der Herdlinientiere sind.

Für die Wildschweine konnte bereits mit Hilfe der Poisson-Gleichung und der Balkendiagramme gezeigt werden, dass sich die Population an allen Loci von den derzeit konsumierten Mastschweinen unterscheidet.

Die Leicoma Tiere unterscheiden sich an 6 von 10 hochinformativen Markerloci von der Verbraucherstudienkohorte, nur an den Loci für TFR2, TLR4, TNFRSF11B und TNF α/β sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Allelverteilung erkennbar.

Die Schwäbisch-Hällischen Tiere weisen an 7 von 10 Markerloci signifikante Unterschiede in ihrer Allelverteilung im Vergleich mit der Verbraucherstudie auf.

An den Loci für TFR2 und TNFRSF12A sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

Die untersuchten Pietrain und Deutsche Landrasse Tiere sind der Verbraucherstudie hinsichtlich ihrer Allelverteilungen an den Markerloci am ähnlichsten. Beide Kohorten weisen nur an drei von 10 Markerloci signifikante Unterschiede auf. Bei den Pietrain Tieren handelt es sich um die Loci für CD95, TLR4 und TNF α/β und bei den Deutsche Landrasse Tieren um die Loci für CD95, Transferrin und IFNAR1/IFNGR2.

Nur am Markerlocus für CD95 zeigen sich für alle 7 Vergleiche signifikante Unterschiede in den Allelverteilungen der Kohorten im Vergleich mit der Verbraucherstudie. Diese Tatsache ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es sich um einen evolutionär alten Marker handelt. Wie bereits im Kapitel 3.1.2 über die Markergüteklassen erwähnt, kam es neben Insertions- bzw. Deletionsereignissen des gesamten Mikrosatellitenmotivs im Laufe der Zeit auch mehrfach zu Leserasterverschiebungen innerhalb des Markermotivs, so dass neben dem ursprünglichen auch unterbrochene Motive beobachtet wurden. Dieser Marker zeichnet sich also durch eine hohe Mutationsrate und somit einer großen Allelvielfalt aus, und solche Marker sind zum Auffinden von Unterschieden zwischen zwei Vergleichsgruppen am geeignetsten.

3.3.5.6 Allelverteilungen in Kohorten kleiner Stichprobengröße und verwandter Tiere

In den nachfolgenden Abbildungen 25a und 25b werden die Allelverteilungen an den 12 untersuchten Markerloci der Kohorten visualisiert, für die aufgrund einer zu kleinen Stichprobengröße oder eines hohen Verwandtschaftsgrades der Tiere keine Allelfrequenzen berechnet werden konnten.

Außerdem werden zusätzlich zu den bereits gezeigten Balkendiagrammen auch an dieser Stelle die Allele der Hampshire, Pietrain und Deutsche Landrasse Tiere aus den Infektionsversuchen dargestellt, da auch diese Tiere teilweise verwandt sind.

Die folgende Darstellungsweise der Allelverteilungen ist sowohl robust gegen den Verwandtschaftsgrad der Tiere als auch gegen die Stichprobengröße.

Anhand der Abbildungen 26a und 26b soll für alle 12 Markerloci zum Einen überprüft werden, ob es sich bei den in den Kohorten kleiner Stichprobengröße bzw. verwandter Tiere identifizierten Allele um dieselben Allele handelt, die auch in den Verbraucherstudienproben, die auch hier als Referenzkohorte dient, mit hoher Frequenz gefunden wurden, und zum Anderen, in welchen Kohorten neue Allele beobachtet wurden.

Der Tabelle 9 in Kapitel 3.3.2 zu der globalen Analyse des Genpools in den Kohorten im Vergleich zu dem Genpool in der Verbraucherstudie für alle Markerloci war bereits zu entnehmen, dass in den Kohorten kleiner Stichprobengröße der Angler-Sattelschweine, der Mini-Lewe Tiere, der Wollschweine, der Bunten Bentheimer und der Hampshire Tiere Allele auftraten, die in der Verbraucherstudie nicht beobachtet wurden.

An dieser Stelle wird nun detailliert anhand der nachfolgenden Grafiken dargestellt, an welchen Markerloci diese neuen Allele beobachtet wurden.

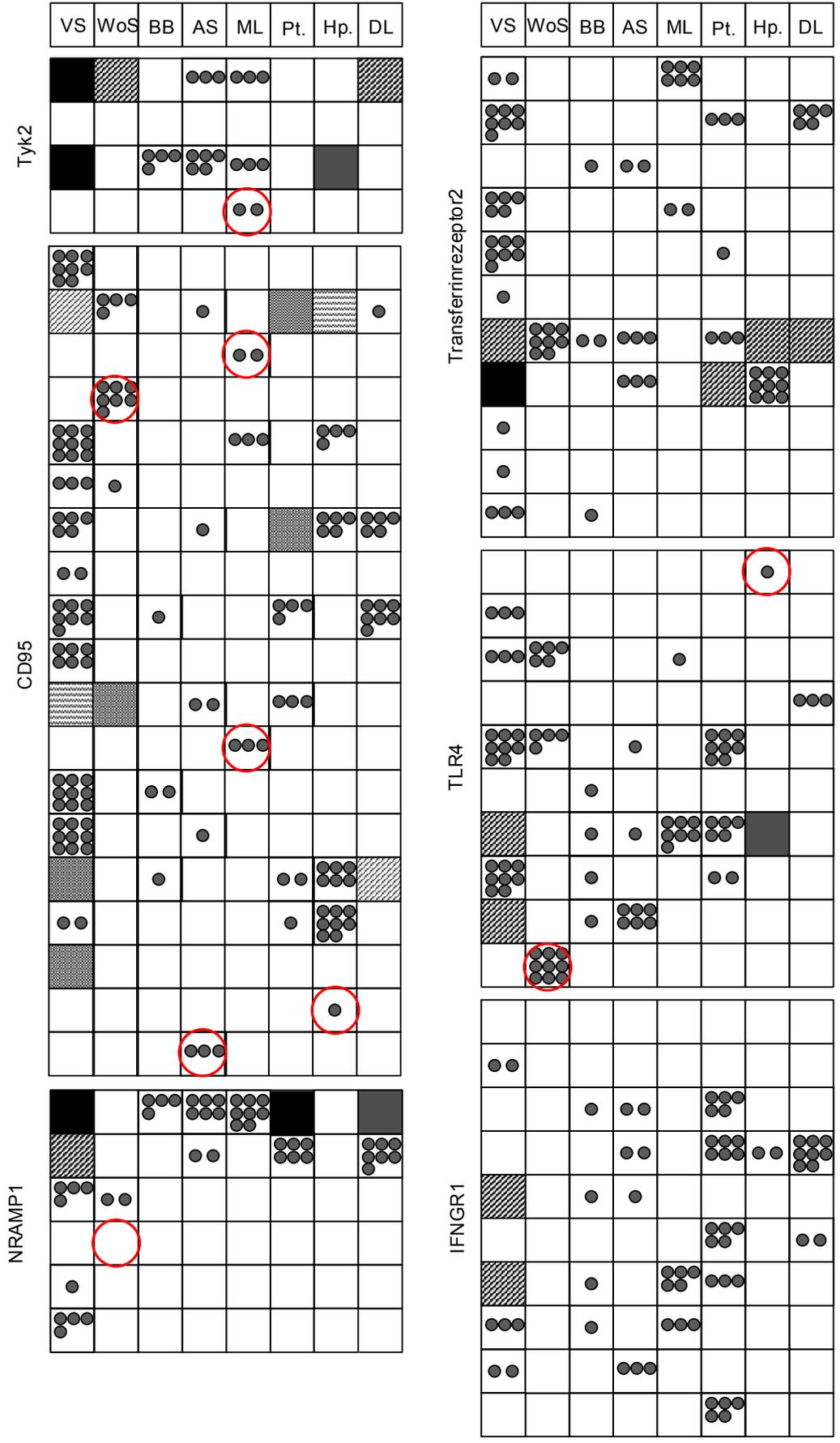


Abbildung 25a : Allelverteilungen in kleinen Stichproben

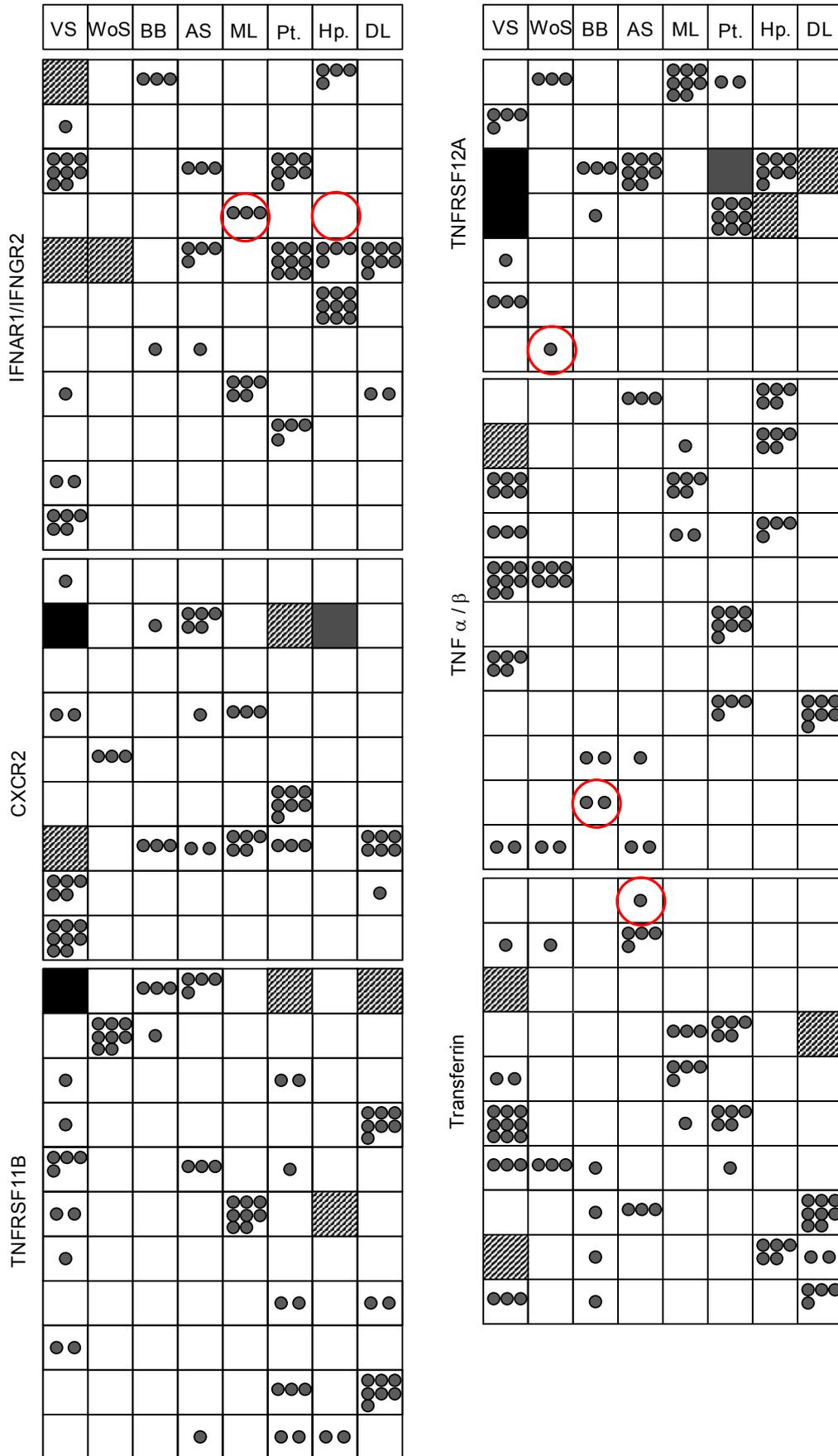
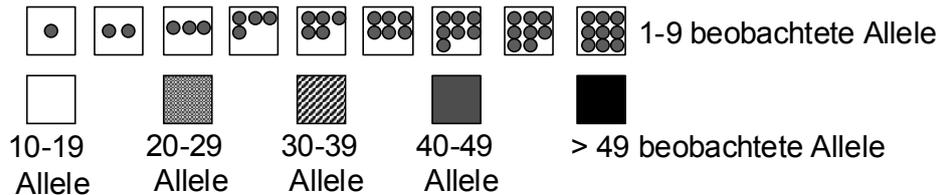


Abbildung 25b: Allelverteilungen in kleinen Stichproben

Legende:

VS: Verbraucherstudie
 WoS: Wollschweine
 BB: Bunte Bentheimer
 AS: Angler Sattelschweine
 ML: Mini Lewe
 Pt.: Pietrain Ferkel aus den Infektionsversuchen
 Hp.: Hampshire Ferkel aus den Infektionsversuchen
 DL: Deutsche Landrasse Ferkel aus den Infektionsversuchen



Die Abbildungen 25a und 25b visualisieren die in den oben genannten Kohorten beobachteten Allele an den bereits zuvor für die Analysen verwendeten 12 Markerloci.

Beobachtungszahlen von 1 – 9 sind als einzelne Punkte dargestellt, größere Beobachtungszahlen wurden zusammengefasst und gemäß der oben gezeigten Muster gekennzeichnet.

Die Figur ist in Blöcke unterteilt, wobei jeder Block einen Markerlocus darstellt (Beschriftung links neben jedem Block). Jede Spalte repräsentiert eine Kohorte. Die Beschriftung befindet sich jeweils einmal über dem ersten und zweiten Teil der zweiseitigen Abbildung und gilt für alle darunterliegenden Markerblöcke. Jede Zeile eines Blocks repräsentiert ein beobachtetes Allel, wobei das kleinste Allel jeweils in obersten Reihe und das größte Allel in der untersten Reihe eines Blocks zu finden ist. Die Allele entsprechen den in den Balkendiagrammen zu jedem Marker auf der X-Achse aufgetragenen Allele. Eine rote Umrandung markiert jeweils die beobachteten Allele in den Kohorten, die in der Verbraucherstudie nicht aufgetreten sind.

Wie aus der Grafik zu ersehen ist, traten bei den Mini-Lewe Schweinen an den Markerloci für Tyk2, CD95 und IFNAR1/IFNGR2 in der Verbraucherstudienkarte nicht beobachtete Allele auf.

Bei den Wollschweinen wurden ebenfalls am CD95 Markerlocus neue Allele identifiziert, sowie auch an den Markerloci für NRAMP1, TLR4 und TNFRSF12A.

Auch die Bunten Bentheimer Tiere zeigten neue Allele am Markerlocus für TNFRSF12A und die Angler Sattelschweine zeigten an den Markerloci für CD95 und Transferrin andere Allele als in der Verbraucherstudie.

Wie in Kapitel 3.3.2 bereits gezeigt werden konnte, ist das Auftreten der neuen Allele in den genannten Kohorten jedoch mit dem Testansatz dieser Arbeit statistisch nicht signifikant.

In den untersuchten Hampshire Tieren wurde eine statistisch signifikante Anzahl anderer Allele als in der Verbraucherstudie identifiziert. Diese Allele traten an den Markerloci für CD95, TLR4 und IFNAR1/IFNGR2 auf.

3.4 Phänotypisierung und Assoziationsstudie

Im Rahmen eines weiteren FUGATO-Teilprojektes wurden an der Tierärztlichen Hochschule Hannover wie unter 2.4 beschrieben Infektionsversuche durchgeführt, in deren Verlauf Schweine unterschiedlicher Rassen mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* infiziert wurden. Ziel dieses Projektes war u.a. die Erstellung eines detaillierten, reproduzierbaren Phänotyps einer Pneumonieerkrankung beim Schwein und die Entwicklung eines Ranking-Systems, das eine Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung am lebenden Tier erlaubt.

Die Auswertung der Infektionsversuche und die Entwicklung des Ranking-Systems wurden von Frau Doris Höltig durchgeführt.

Die Ergebnisse des Rankings von insgesamt 100 Tieren aus den Infektionsversuchen wurden von Frau Höltig für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Insgesamt standen Rankingwerte für 35 Tiere der Deutschen Landrasse, 28 Pietrain Tiere, 21 Hampshire Tiere und 16 Large White Tiere zur Verfügung. Die Tiere der Deutschen Landrasse stammen aus 11 Familien mit 10 verschiedenen Sauen und 9 verschiedenen Ebern, die Pietrain Tiere aus 18 Familien mit 13 verschiedenen Sauen und 13 verschiedenen Ebern, die Hampshire Tiere aus 12 Familien mit 11 verschiedenen Sauen und 10 verschiedenen Ebern und die Large White Tiere aus 12 Familien mit 9 verschiedenen Sauen und 7 verschiedenen Ebern. Die Rankingwerte und detaillierte Informationen zu den Familienstrukturen sind der Tabelle 26 im Anhang zu entnehmen.

3.4.1 Rasseunterschiede im Schweregrad der Erkrankung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob anhand der Rankingwerte Rasseunterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* zu erkennen sind.

3.4.1.1 Nicht parametrischer Vergleich des Schweregrades der Erkrankung zwischen den Rassen

Zunächst wurde ein nicht parametrischer Vergleich des Schweregrades der Erkrankung nach *A. pleuropneumoniae* Infektion zwischen den Rassen angestellt.

Alle 100 untersuchten Tiere wurden unabhängig von ihrer Rasse nach aufsteigenden Rankingwerten, also auch zunehmender Schwere der Erkrankung, sortiert und allen Tieren anschließend Rangwerte von 1 bis 100 zugeordnet, so dass am Ende Rang 1 dem am mildesten erkrankten Tier und Rang 100 dem am schwersten erkrankten Tier entsprach.

Bei mehrfach vergebenen Rankingwerten wurden die zugehörigen Rangwerte für die Tiere entsprechend korrigiert, indem allen Tiere mit demselben Rankingwert jeweils ein gemittelter Rangwert zugeordnet wurde. Das bedeutet, falls drei Tiere mit demselben Rankingwert auftraten, die z.B. den Rängen 3,4,5 entsprechen würden, so erhielten alle drei Tiere den Rangwert 4.

Anschließend wurden die Tiere wieder nach Rassen und innerhalb der Rasse aufsteigenden Rangwerten sortiert.

Für die grafische Darstellung des Anstiegs der Rangwerte innerhalb einer Rasse, d.h. des Anstiegs der Schwere der Erkrankung der einzelnen Tiere, wurden die einzelnen Tiere für jede Rasse auf 100 Prozent normiert, um die Rassen trotz unterschiedlicher Tieranzahl vergleichen zu können. Daraus ergibt sich, dass z.B. im Falle der 35 Tiere der Deutschen Landrasse das Tier mit dem niedrigsten Rangwert dieser Rasse 2,86 % entsprach, das Tier mit dem nächsthöheren Rangwert 5,72 % usw. bis zu 100 % für das Tier mit dem höchsten Rangwert innerhalb dieser Rasse.

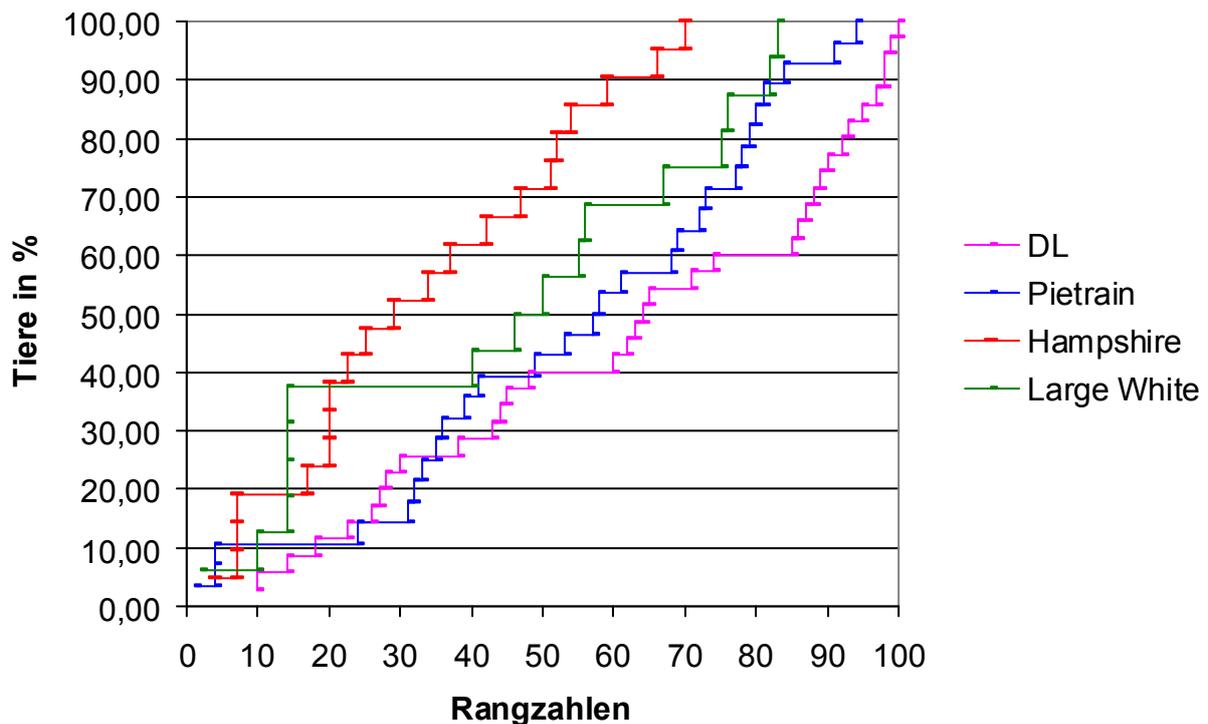


Abbildung 26: Nicht parametrischer Vergleich des Schweregrades der Erkrankung zwischen den Rassen

Auf der X-Achse sind die Rangzahlen aller Tiere für jede Rasse getrennt aufgetragen.

Auf der Y-Achse wurde jedes Tier einer Rasse auf 100 % normiert aufgetragen.

Wie anhand der Grafik zu erkennen ist, waren die untersuchten Tiere der Deutschen Landrasse nach *A. pleuropneumoniae* Infektion am schwersten erkrankt, darauf folgten die Pietrain und Large White Tiere. Die geringste Suszeptibilität gegenüber einer *A. pleuropneumoniae* Infektion wiesen die Hampshire Tiere des Testsets auf.

Bei dieser Art der Auswertung ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei den untersuchten Tieren jeder Rasse um teilweise verwandte Tiere handelte, so dass im Hinblick auf Infektionssuszeptibilität an dieser Stelle keine Aussage für die gesamte Rasse getroffen werden kann. Bei Betrachtung der Rankingrohdaten (Tabelle 26 im Anhang) wird deutlich, dass besonders innerhalb der Tiere der Deutschen Landrasse eine Wurfabhängigkeit hinsichtlich der Infektionssuszeptibilität besteht. Die im Verlauf der Infektionsversuche am schwersten erkrankten Tiere stammten nur aus zwei unterschiedlichen Familien der Deutschen Landrasse, die im Testset mit 9 bzw. 6 Ferkeln die größten Würfe aufwiesen. Die Varianz hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung der Ferkel war in diesen Würfen am größten. Es traten in beiden Würfen sowohl sehr mild erkrankte als auch sehr schwer erkrankte Tiere auf.

3.4.1.2 Rangtest nach Mann-Whitney

Um zu überprüfen, ob es statistisch signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Rassen hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung nach Infektion mit *A. pleuropneumoniae* gibt, wurde ein Rangtest nach Mann-Whitney durchgeführt (siehe 2.10.4).

Im Unterschied zu der grafischen Darstellung in Abbildung 27 wurden für diesen Test nicht alle Tiere einer Familie einbezogen, sondern die Rankingwerte für jede Familie jeder Rasse gemittelt, so dass am Ende jeder Familie ein mittlerer Rankingwert zugeordnet werden konnte, d.h. die Varianz der Schwere der Erkrankung innerhalb eines Wurfes wurde somit eliminiert und der Vergleich erfolgte zwischen unverbundenen Stichproben. Die mittleren Rankingwerte für jede Familie sind der Tabelle 26 im Anhang zu entnehmen.

Bei dem Rangtest nach Mann-Whitney werden jeweils zwei Gruppen, in diesem Fall Rassen, miteinander verglichen. Für einen paarweisen Vergleich aller vier Rassen wurden folglich sechs Vergleiche durchgeführt.

Für einen Vergleich zweier Rassen wurden die mittleren Rankingwerte aller Familien der zwei zu vergleichenden Rassen aufsteigend sortiert und jedem Rankingwert eine Rangzahl zugeordnet. Bei mehrfach auftretenden Rankingwerten wurden die Rangzahlen wie unter 3.4.1.1 beschrieben korrigiert. Anschließend wurden die Rangwerte nach Rassen sortiert und aufsummiert.

Die Berechnung der Prüfgröße U erfolgte nach der unter 2.10.4 angegebenen Formel.

Für die sechs durchgeführten Vergleiche ergaben sich folgende Ergebnisse:

Vergl. der Rassen	U _{min}	U*	Irrtumswahrscheinlichkeit α
DL – Pt.	83	55	>> 0,05 (n.s.)
DL – Hp.	38	33	≈ 0,1
DL – LW	46	33	> 0,05 (n.s.)
Pt. – Hp.	42,5	61	< 0,05
Pt. – LW	63	61	≈ 0,05
Hp. – LW	85	37	>> 0,05 (n.s.)

DL: Deutsche Landrasse

Pt.: Pietrain

Hp.: Hampshire

LW: Large White

n.s.: nicht signifikant

U*: kritischer U Wert für $\alpha = 5\%$, d.h. wenn $U_{min} \leq U^*$ besteht ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung zwischen den verglichenen Gruppen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es beim Vergleich der Rassen Pietrain vs. Hampshire statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung nach einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* gibt.

Auch die Vergleiche Pietrain vs. Large White und Deutsche Landrasse vs. Hampshire ergaben tendenziell signifikante Unterschiede.

Auf Basis dieser Ergebnisse lassen sich die vier Rassen hinsichtlich der Schwere der Erkrankung nach Infektion mit *A. pleuropneumoniae* folgendermaßen aufsteigend nach Schweregrad der Erkrankung sortieren:

1. Hampshire
2. Large White
3. Deutsche Landrasse
4. Pietrain

3.5 Assoziationsstudie

Mit Hilfe einer Assoziationsstudie im Sinne eines Case-Control Vergleichs über alle in den Infektionsversuchen verwendeten Rassen, sollen Gene bzw. Markerloci identifiziert werden, die assoziiert sind mit dem Phänotyp der Tiere mild bzw. schwer erkrankt nach Infektion mit *A. pleuropneumoniae*. Die Analyse der Daten wird mittels der Software FAMHAP erfolgen.

Da die Genotypisierung der Versuchstiere noch nicht abgeschlossen ist, können in dieser Arbeit noch keine Ergebnisse für die Assoziationsstudie präsentiert werden.

In den folgenden Kapiteln wird kurz die Funktionsweise der FAMHAP-Software beschrieben und erläutert, nach welchen Kriterien die Tierausswahl erfolgte, deren Genotypen später miteinander verglichen werden sollen.

3.5.1 Das FAMHAP-Programm

Das Programm FAMHAP wurde von Herrn Dr. Tim Becker an der Universität Bonn für die Haplotypenanalyse nah beieinander gelegener Marker (sowohl Mikrosatelliten als auch SNPs) entwickelt. Aus realen Genotypdatensätzen von Familien konstruiert FAMHAP im Falle von nicht informativen Phasen zunächst alle möglichen paternalen und maternalen Haplotypen für die untersuchten Marker und ordnet jedem Haplotyp ein Gewicht gemäß der Wahrscheinlichkeit seines Auftretens zu.

Diese Wichtung nimmt die Software anhand des gesamten Datensatzes vor, der zur Auswertung betrachtet wird.

Eine nicht informative Phase bedeutet, dass für ein Allel eines Nachkommen nicht eindeutig bestimmt werden kann, von welchem Elternteil es vererbt wurde.

Außerdem konstruiert FAMHAP fehlende mögliche Genotypen aus den real vorhandenen Genotypen der bisher typisierten Eltern und Nachkommen und bezieht sie in die Analysen mit ein.

Mit Hilfe der konstruierten Haplotypen werden nun Assoziationsanalysen durchgeführt. Nach Monte-Carlo-Simulationen werden für alle Haplotypenvergleiche p-Werte berechnet, um beurteilen zu können, ob die verglichenen Haplotypen signifikante Unterschiede aufweisen (Becker und Knapp 2004).

3.5.2 Tierausswahl für FAMHAP

3.5.2.1 Auswahl der extremsten Phänotypen

Wegen des hohen Verwandtschaftsgrads der Ferkel aus den Infektionsversuchen bestand zunächst die Aufgabe, unabhängig von der Rasse, möglichst viele unverwandte Tiere mit extremen Phänotypen zu identifizieren, die anschließend mittels FAMHAP-Analyse miteinander verglichen werden können.

Zu diesem Zweck wurden die insgesamt 100 Tiere aller vier Rassen aus den Infektionsversuchen zunächst auf die extremsten Tiere jeder Familie reduziert, d.h. es wurden zwei Tiergruppen gebildet. Die eine enthält jeweils die am mildesten erkrankten Ferkel einer Familie, die andere jeweils die am schwersten erkrankten Ferkel einer Familie. Bei insgesamt 53 Familien wurden also zwei Gruppen mit jeweils 53 Tieren gebildet (11 Tiere der Deutschen Landrasse, 18 Pietrain Tiere, 12 Hampshire Tiere und 12 Large White Tiere).

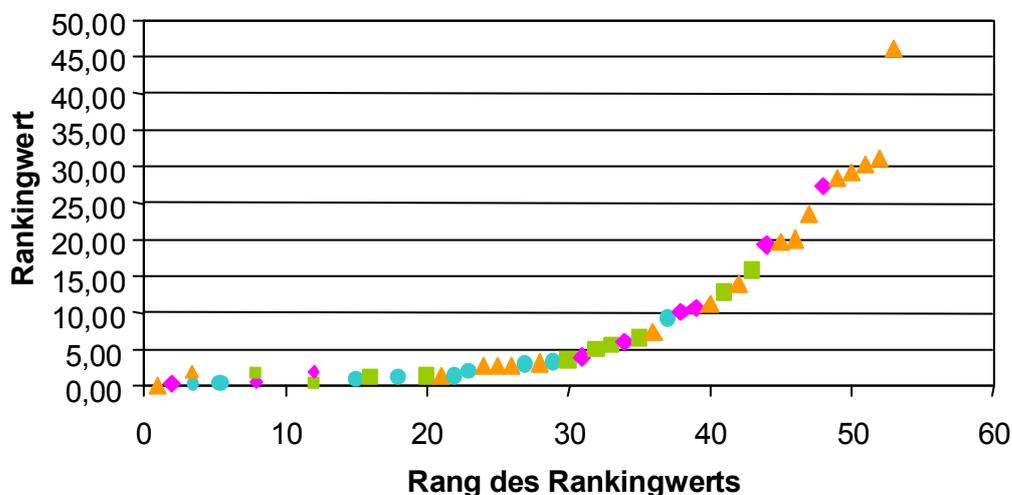


Abbildung 27: Gruppe 1; Reihenfolge der Versuchstiere nach aufsteigender Krankheitsschwere bei Berücksichtigung des jeweils am mildesten erkrankten Ferkels pro Familie. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier.

Deutsche Landrasse

Pietrain

Hampshire

Large White

Auf der X-Achse ist der dem jeweiligen Rankingwert eines Tiere zugehörige Rangwert aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der zugehörige Rankingwert abzulesen.

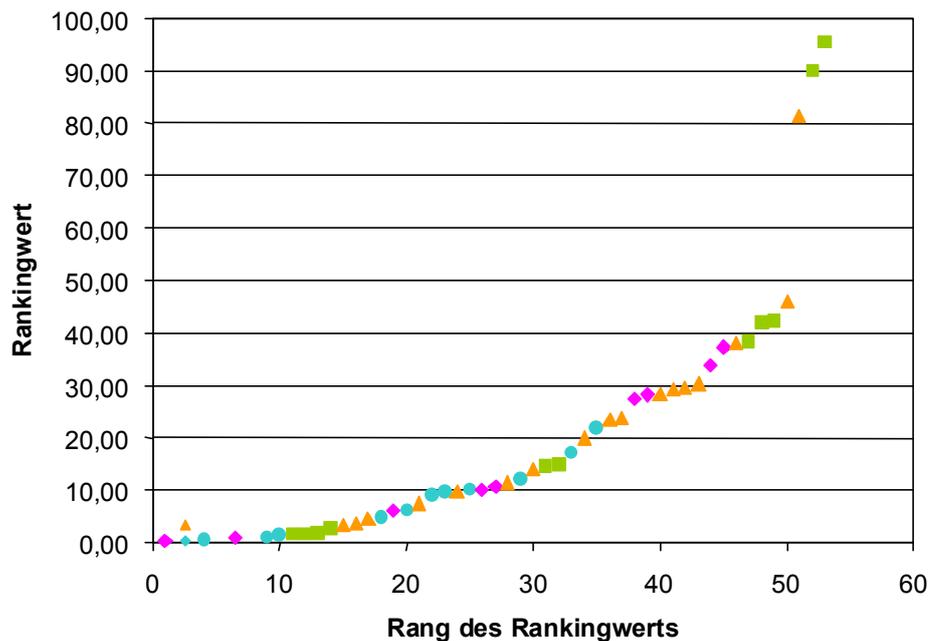


Abbildung 28: Gruppe 2; Reihenfolge der Tiere nach aufsteigender Krankheitsschwere bei Berücksichtigung des jeweils am schwersten erkrankten Ferkels pro Familie. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier.

Deutsche Landrasse



Pietrain



Hampshire



Large White



Auf der X-Achse ist der dem jeweiligen Rankingwert eines Tiere zugehörige Rangwert aufgetragen.

Auf der Y-Achse ist der zugehörige Rankingwert abzulesen.

Auf Basis dieser Vorauswahl der jeweils am mildesten und am schwersten erkrankten Tiere pro Wurf, wurden anschließend für die FAMHAP-Analysen aus Gruppe 1 die 16 am mildesten erkrankten Tiere und aus Gruppe 2 die 16 am schwersten erkrankten Tiere als extremste kontrastierende Phänotypen ausgewählt (siehe Tabelle 27 im Anhang).

3.5.2.2 Auswahl konkordanter und diskordanter Paare

Neben dem Vergleich der Genotypen von unverwandten Tieren mit extremen Phänotypen wird auch ein Vergleich konkordant mild und schwer bzw. diskordant erkrankter Geschwisterpaare (je ein mild und ein schwer erkranktes Ferkel pro Familie) durchgeführt werden. Der Vergleich von Geschwisterpaaren, die unter gleichen Haltungsbedingungen aufgewachsen sind, ist im Hinblick auf die Identifizierung genetischer Resistenzfaktoren informativer.

Zwar können systematische Umwelteinflüsse (z.B. gleiche Futterbedingungen) nicht eliminiert werden, aber der Einfluss zufälliger Umgebungsfaktoren auf die Krankheitssuszeptibilität ist reduziert und somit der Einfluss genetischer Faktoren größer.

Für die Auswahl konkordant mild und schwer erkrankter Geschwisterpaare sowie diskordanter Paare für die nachfolgenden FAMHAP-Analysen wurden alle 100 Versuchstiere unabhängig von den Rassen berücksichtigt.

Das 50% Quantil der Rankingwerte aller Tiere liegt bei 9, d.h. alle Tiere mit einem Rankingwert > 9 wurden bei der Paarauswahl als schwer erkrankt eingestuft.

Tabelle 12: Krankheitsmanifestation und Intra-Paar-Diskordanz der ausgewählten Paare

Konkordant mild erkrankte Geschwisterferkel 14 Paare			
	Median	Innere Quartile	Range
Schweregrad der Erkrankung in Rankingwerten	1,4	0,8 – 2,8	0,2 – 7,6
Intra-Paar-Diskordanz	0,9	0,5 – 3,5	0 – 6,9
Konkordant schwer erkrankte Geschwisterferkel 10 Paare			
Schweregrad der Erkrankung in Rankingwerten	38,0	19,3 – 89,8	11,3 – 95,6
Intra-Paar-Diskordanz	9,9	0,2 – 22,6	0,1 – 32,2
Diskordant erkrankte Geschwisterferkel 15 Paare			
Schweregrad der Erkrankung in Rankingwerten	6,6	3,0 – 21,9	0,5 – 95,6
Intra-Paar-Diskordanz	20,9	9,5 – 33,1	6,8 – 89,0

Aus den zur Verfügung stehenden 53 Familien aus vier Rassen wurde jeweils die höchstmögliche Anzahl an Paaren für jede Gruppe gebildet, so dass nun 14 konkordant mild erkrankte Paare, 10 konkordant schwer erkrankte Paare und 15 diskordante Paare für die zukünftigen Analysen zur Identifizierung von Genloci, die die Suszeptibilität von Schweinen gegenüber einer Atemwegsinfektion modulieren, verwendet werden können. Dies ist zwar eine relativ geringe Anzahl an Paaren, aber in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe zur Identifizierung von Modulatoren der Cystischen Fibrose konnte gezeigt werden, dass bereits 10 Paare für eine solche Analyse ausreichend sind, um genetische Unterschiede zwischen den Paaren aufzudecken (Kumar et al. 2008).

Die Daten zeigen, dass sich die konkordant mild erkrankten Ferkel mit einem Median-Wert der Intrapaaardiskordanz von 0,9 ähnlicher sind als die konkordant schwer erkrankten Ferkel mit einem Medianwert für die Intrapaaardiskordanz von 9,9. Dies ist dadurch zu erklären, dass das Rankingwertspektrum der als schwer erkrankt

deklarierten Tiere mit Werten von 9 bis 96 wesentlich breiter ist als das Spektrum der mild erkrankten Tiere von 0,2 bis 9.

Für die ausgewählten diskordant erkrankten Paare ist an dem Medianwert der Intra-Paar-Diskordanz dieser Gruppe von 20,9 zu erkennen, dass sich diese Paare hinsichtlich ihres Schweregrades der Erkrankung tatsächlich am meisten unterscheiden.

Beim Vergleich der Spannbreiten der Rankingwerte für die konkordant mild und konkordant schwer erkrankten Paare wird deutlich, dass sich die Phänotypen der mild und schwer erkrankten Tiere nicht überlappen, d.h. die beiden Gruppen sind deutlich voneinander abgrenzbar und somit geeignet für die Vergleichsanalysen ihrer Genotypen zum Auffinden von Unterschieden. Der höchste Rankingwert für ein Ferkel aus der Gruppe der konkordant mild erkrankten Ferkel liegt bei 7,6 und der niedrigste Rankingwert für ein Ferkel aus der Gruppe der konkordant schwer erkrankten Paare liegt bei 11,3.

3.5.2.3 Gütetest für die Elternauswahl

Zur Qualitätsüberprüfung der Tierausswahl für die Infektionsversuche wurde mittels Heterozygotietest der Verwandtschaftsgrad der Elterntiere zu den Versuchstieren beurteilt. Ein hoher Verwandtschaftsgrad der Eltern hätte zur Folge, dass der Genpool der Versuchstiere kleiner ist als angenommen und somit die Versuchstiere nicht als unabhängig betrachtet werden können. Das Problem der Verwandtschaft innerhalb der Versuchstiere kann durch die zuvor beschriebene Tierausswahl unverwandter Tiere mit extremen Phänotypen behoben werden, wohingegen die Verwandtschaft der Eltern nicht korrigiert werden kann. Die Folge wäre, dass bei einer vorhandenen Assoziation zwischen dem Genotyp bzw. eines bestimmten Allels an einem Markerlocus und dem Schweregrad der Erkrankung eines Versuchstieres dieser Befund nicht auf ein beliebiges Tier übertragen werden kann.

Der Grund dafür, dass eine Phänotyp/Genotypassoziation mittels Mikrosatellitenmarker identifiziert werden kann, ist, dass der Marker gekoppelt mit der krankheitsverursachenden Mutation vererbt wird. Das Auftreten eines bestimmten Markerallels ist demnach mit einem bestimmten Phänotyp assoziiert, weil sich der Marker im Kopplungsgleichgewicht mit der kausalen Mutation befindet.

Wieviele Basenpaare eine solche Kopplungsgruppe umfasst, kann sehr unterschiedlich sein. Die größte bekannte Kopplungsgruppe beim Menschen umfasst z.B. 2.000.000 bp. Dieser konservierte Haplotypblock wurde im Zusammenhang mit Lactase-Persistenz afrikanischer Bevölkerungsgruppen, d.h. der Fähigkeit, auch im Erwachsenenalter weiterhin Milchprodukte verstoffwechseln zu können, identifiziert (Tishkoff et al. 2007).

Je weiter der Marker und die kausale Mutation jedoch voneinander entfernt liegen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie in irgendeiner Generation voneinander getrennt werden. Es besteht also die Möglichkeit, dass die kausale Mutation (der SNP), die für in diesem Falle den Phänotyp mild bzw. schwer erkrankt nach Infektion mit *A. pleuropneumoniae* verantwortlich ist, nicht in der gesamten Schweinepopulation in einer Kopplungsgruppe mit dem Mikrosatelliten ist, sondern nur innerhalb der untersuchten Familien.

Trotzdem ist eine Grobkartierung des Effekts mittels Mikrosatellitenanalyse sinnvoll, um den genomischen Bereich einzugrenzen, der für eine veränderte Infektionssuszeptibilität verantwortlich ist.

Die auf Basis der Allelfrequenzen in der Referenzkohorte der Verbraucherstudie berechneten Heterozygotiefrequenzen an allen untersuchten 12 Markerloci bilden den Erwartungswert für den Anteil an homo- bzw. heterozygoten Tieren in den untersuchten Elterntierpopulationen im Falle von unverwandten Tieren.

Mittels der Clump-Software wurden die realen Beobachtungszahlen von homo- bzw. heterozygoten Tieren an allen Markerloci mit den Erwartungswerten verglichen.

Für die p-Wert Berechnung wurden jeweils eine Million Simulationen durchlaufen. Zur Beurteilung der Signifikanz wird der p-Wert aus dem T1 Algorithmus der Software angegeben. Ab einem p-Wert < 0,05 wurde ein Vergleich als signifikant unterschiedlich bewertet.

Das bedeutet, an allen Markerloci, für die kein signifikanter Unterschied zu den Erwartungswerten gefunden wurde, verhalten sich die Elterntiere wie eine Outbred-Population und werden als unverwandt eingestuft.

Aus Zeitgründen konnten die Elterntiere zu den Large White Ferkeln aus den Infektionsversuchen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Tabelle 13: Ergebnisse der Deutschen Landrasse Elterntiere

Marker	H [%]*	n typ.	Soll het.	Ist het.	Soll homo.	Ist homo.	p-Wert**
CD95	87	11	10	4	1	7	0,023767
TF	80	19	15	18	4	1	0,339624
TFR2	74	11	8	8	3	3	1,000000
TLR4	80	11	9	5	2	6	0,182455
IFNGR1	85	11	9	9	2	2	1,000000
IFNAR1/ IFNGR2	82	11	9	4	2	7	0,080618
CXCR2	76	11	8	9	3	2	1,000000
TNFRSF 11B	63	11	7	6	4	5	1,000000
TNFRSF 12A	64	11	7	7	4	4	1,000000
TNF α/β	85	11	9	7	2	4	0,634791
NRAMP1	50	11	6(5,5)	3	5(5,5)	8	0,386943

* *Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen (10 Tests) sind p-Werte < 0,00512 als signifikant zu bewerten

* H auf Basis der Allelfrequenzen in der Verbraucherstudienkohorte

n typ.: Anzahl der für den jeweiligen Marker typisierten Tiere; entspricht 100 % für die Berechnung der Soll-werte bzw. der Ist-Werte

Soll het. / Soll homo.: auf Basis des Heterozygotieindex berechnete Anzahl der erwarteten hetero- bzw. homozygoten Tiere

Ist het. / Ist homo.: tatsächlich beobachtete Anzahl hetero- bzw. homozygoter Tiere

Die Elterntiere der Deutschen Landrasse verhalten sich an 10 von 12 Markerloci wie eine Outbred-Population. Lediglich an den Markerloci für CD95 und IFNAR1/IFNGR2 zeigen sich ohne Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen tendenziell signifikante Unterschiede zwischen dem Erwartungswert für homo- und heterozygote Tiere und den real beobachteten Zahlen.

Die Tiere können demnach als weitgehend unverwandt eingestuft werden.

Dass an den Markerloci für CD95 und IFNAR1/IFNGR2 ein erhöhter Homozygotiegrad beobachtet wurde kann entweder ein zufälliger Effekt aufgrund der Verwandtschaft der Tiere sein oder biologische Gründe haben.

Um dieses zu überprüfen, müssten weitere unverwandte Deutsche Landrasse Tiere typisiert werden. Falls es sich um einen biologischen Effekt handelt, der spezifisch ist für Deutsche Landrasse Tiere, wäre zu erwarten, dass sich der erhöhte Homozygotiegrad an den beiden Markerloci bestätigt.

Welche biologische Bedeutung eine Anreicherung jeweils eines Allels an den beiden Markerloci hat, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht zu klären, aber eine Hypothese wäre, dass die Anreicherung von homozygoten Individuen an den beiden Markerloci in irgendeiner Weise vorteilhaft ist für die Ausbildung der funktionsfähigen Rezeptorkomplexe und somit auch für die Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskaden. So ein Mechanismus wurde bereits für das Mannose-Bindende-Lectin (MBL) beschrieben. Dabei handelt es sich um ein homotrimeres Protein, das die Aktivierung des Komplementsystems vermittelt und daher eine wichtige Rolle bei der Infektabwehr spielt. Heterozygote Träger eines defekten Allels anfälliger sind für Infektionen, da in einige der homotrimeren Proteine das defekte Allel eingebaut wird und diese Proteine somit nicht funktionsfähig sind (Garred et al. 2008).

Auch bei CD95, IFNAR1 und IFNGR2 handelt es sich um multimere Rezeptoren.

CD95 (Fas; TNFRSF6) ist ein sogenannter „death receptor“ der Tumornekrosefaktorrezeptorsuperfamilie. Das Typ I Transmembranprotein bildet nach Bindung seines Liganden (FasL) den „Death Inducing Signalling Complex“ (DISC), in dem der Rezeptor dann als Homotrimer vorliegt. Diese Trimerisierung des Rezeptors führt im Regelfall zu Apoptose der Zielzelle.

IFNAR1 und IFNAR2 bilden zusammen den heterodimeren Rezeptor für Interferon alpha und beta. Die Aktivierung des Komplexes bewirkt die Auslösung der JAK/STAT (Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) –Signalkaskade an deren Ende die aktivierten STATs im Zellkern als Transkriptionsfaktoren wirken.

IFNGR1 und IFNGR2 bilden zusammen den ebenfalls heterodimeren Rezeptor für Interferon gamma, wobei IFNGR1 die Ligandenbindedomäne darstellt.

Tabelle 14: Ergebnisse der Pietrain Elterntiere

Marker	H [%]*	n typ.	Soll het.	Ist het.	Soll homo.	Ist homo.	p-Wert**
CD95	87	26	23	18	3	8	0,173366
TF	80	26	21	26	4	2	0,050498
TFR2	74	26	19	14	7	12	0,249713
TLR4	80	26	21	19	5	7	0,510388
IFNGR1	85	26	22	26	4	0	0,110257
IFNAR1/ IFNGR2	82	26	21	23	5	3	0,703746
CXCR2	76	26	20	15	6	11	0,237125
TNFRSF 11B	63	26	16	17	10	9	1,000000
TNFRSF 12A	64	26	17	9	9	17	0,051443
TNF α/β	85	26	22	20	4	6	0,726824
NRAMP1	50	26	13	7	13	19	0,153421

* *Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen (10 Tests) sind p-Werte < 0,00512 als signifikant zu bewerten

* H auf Basis der Allelfrequenzen in der Verbraucherstudienkohorte

n typ.: Anzahl der für den jeweiligen Marker typisierten Tiere; entspricht 100 % für die Berechnung der Soll-werte bzw. der Ist-Werte

Soll het. / Soll homo.: auf Basis des Heterozygotieindex berechnetete Anzahl der erwarteten hetero- bzw. homozygoten Tiere

Ist het. / Ist homo.: tatsächlich beobachtete Anzahl hetero- bzw. homozygoter Tiere

Die Pietrain Elterntiere verhalten sich an 10 von 12 Markerloci wie eine Outbred-Population. Ohne Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen dem Erwartungswert für homo- und heterozygote Tiere und den real beobachteten Zahlen an den Markerloci für Transferrin und TNFRSF12A.

Wie zuvor bereits erwähnt, ist das vermehrte Auftreten heterozygoter Tiere am Transferrin Locus wahrscheinlich auf unvermeidbare Typisierungsfehler aufgrund der Beschaffenheit des Markers zurückzuführen.

Diese Elterntiere können demnach ebenfalls als weitgehend unverwandt eingestuft werden.

Der Grund für das vermehrte Auftreten homozygoter Tiere am Locus für TNFRSF12A kann auch hier entweder in der Verwandtschaft der Tiere liegen oder ein biologischer Effekt sein, der spezifisch ist für die Pietrain Tiere. Zur Klärung, ob dieser erhöhte Homozygotiegrad auch in anderen Pietrain Populationen wiederfinden lässt, müssten weitere unverwandte Pietrain Tiere typisiert werden.

Im Falle einer biologischen Ursache wäre denkbar, dass das Markerallel, das sich in der untersuchten Population der Pietrain Tiere homozygot angereichert hat, gekoppelt ist mit einer nicht funktionalen Variante des TNFRSF12A Proteins. Somit könnte eine Homozygotie für dieses Allel am Markerlocus einhergehen mit einem kompletten Ausfall der Genfunktion. Da die untersuchten Pietrain Tiere am suszeptibelsten für eine Infektion mit *A. pleuropneumoniae* waren, wäre bei Richtigkeit der Hypothese denkbar, dass diese Linie nicht in der Lage ist, den Ausfall des Gens mit Hilfe anderer Signalwege zu kompensieren und sich dieses nachteilig auf die Infektabwehr auswirkt. TNFRSF12A gehört zur Tumornekrosefaktorrezeptorsuperfamilie. Sein Ligand ist das Protein TWEAK (TNF like weak inducer of apoptosis). Einige der durch die Ligandenbindung induzierten Chemokine spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten wie z.B. Lupus (Zhao et al. 2007).

Tabelle 15: Ergebnisse der Hampshire Elterntiere

Marker	H [%]*	n typ.	Soll het.	Ist het.	Soll homo.	Ist homo.	p-Wert**
CD95	87	21	18	15	3	6	0,454101
TF	80	21	17	19	4	2	0,662683
TFR2	74	21	16	9	5	12	0,058051
TLR4	80	21	17	5	4	16	0,000485
IFNGR1	85	21	18	12	3	9	0,085412
IFNAR1/ IFNGR2	82	21	17	10	4	11	0,051933
CXCR2	76	21	16	1	5	20	0,000003
TNFRSF 11B	63	21	13	14	8	7	1,000000
TNFRSF 12A	64	21	13	11	8	10	0,756145
TNF α/β	85	21	18	18	3	3	1,000000
NRAMP1	50	21	11(10,5)	7	10(10,5)	14	0,350468

* *Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen (10 Tests) sind p-Werte < 0,00512 als signifikant zu bewerten; * H auf Basis der Allelfrequenzen in der Verbraucherstudienkohorte

n typ.: Anzahl der für den jeweiligen Marker typisierten Tiere; entspricht 100 % für die Berechnung der Soll-werte bzw. der Ist-Werte

Soll het. / Soll homo.: auf Basis des Heterozygotieindex berechnete Anzahl der erwarteten hetero- bzw. homozygoten Tiere

Ist het. / Ist homo.: tatsächlich beobachtete Anzahl hetero- bzw. homozygoter Tiere

Im Gegensatz zu den Deutsche Landrasse und Pietrain Elterntieren sprechen die Ergebnisse für die Hampshire Elterntiere dafür, dass es sich um eine consanguine Population handelt. An den Markerloci für Transferrinrezeptor 2, IFNGR1 und IFNAR1/IFNGR2 verhalten sich die Tiere tendenziell nicht wie eine Outbred-Population und nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen zeigen sich noch hochsignifikante Unterschiede an den Loci für TLR4 und CXCR2, d.h. es sind überzufällig mehr homozygote Tiere beobachtet worden als erwartet.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den auffälligen Befunden innerhalb der Nachkommen der hier untersuchten Elterntiere, die anhand der Balkendiagrammdarstellung der Allelverteilungen an allen 12 Markerloci erörtert wurden. An den Loci für TLR4 und CXCR2 sind alle untersuchten Nachkommen für ein einziges Allel je Locus homozygot (abgesehen von einer Einzelbeobachtung eines weiteren Allels am TLR4 Locus). Allerdings sind die Ferkel am CXCR2 Locus obligat homozygot, da bereits alle Elterntiere an diesem Locus für ein Allel homozygot waren. Lediglich in Elterntier trug ein anderes Allel, so dass auch theoretisch nur zwei Ferkel von 21 hätten heterozygot sein können. Am TLR4 Locus hingegen hätten theoretisch 9 von 21 Ferkeln heterozygot sein können, beobachtet wurde aber nur eins.

Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse, dass sich die untersuchten Eltern-Hampshire Tiere an 5 von 11 Markerloci nicht wie eine Outbred-Population verhalten und auch die zugehörigen Ferkel an allen betrachteten Markerloci eine starke Allelverarmung zeigen, für einen Gendrift-Effekt. Dieser ist wahrscheinlich auf die geringe Größe der Ausgangspopulation der hier untersuchten Hampshire Tiere zurückzuführen.

Denkbar wäre, dass es außerdem zufällig zu einer Anreicherung von Allelen im Rahmen von Selektionen auf gewünschte Eigenschaften wie z.B. hohe Fleischqualität und Reproduktionsfähigkeit gekommen ist.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Markerentwicklung

Im Verlauf dieser Arbeit ist es gelungen, für 35 Kandidatengene, die potentiell die Suszeptibilität von Schweinen gegenüber Atemwegserkrankungen modulieren, informative Mikrosatellitenmarker zu entwickeln.

Neben dem Einsatz der Marker zur Verbesserung der Tiergesundheit ist in Zukunft auch ein Einsatz für Untersuchungen denkbar, um humane Krankheiten besser zu verstehen.

Zum Beispiel ist es kürzlich gelungen, Schweine mit einer gezielten Störung beider CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)-Allele zu züchten, die dieselben Krankheitssymptome entwickeln wie neugeborene Menschen mit Cystischer Fibrose (Rogers et al. 2008). Mit Hilfe der etablierten Marker könnten die verschiedenen genetischen Hintergründe der transgenen Schweine an den potentiellen Resistenzloci analysiert werden.

Falls im Verlauf der zukünftigen Analysen Markerallele identifiziert werden können, die mit verminderter Suszeptibilität assoziiert sind, so könnte anhand der Genotypen der transgenen Schweine an diesen Loci eine Vorhersage über ihre Anfälligkeit gegenüber Atemwegserkrankungen getroffen werden.

4.2 Diversitätsstudie

Mit Hilfe der durchgeführten Verbraucherstudie konnte gezeigt werden, dass derzeit keine Selektion auf Resistenz in der Mastschweinzucht durchgeführt wird. Der Genpool der rezenten Mastschweinpopulation zeigte an allen 12 untersuchten Resistenzloci die größte Variabilität.

Die Allelvielfalt aller untersuchten Rassen war im Vergleich mit der Verbraucherstudie an allen Loci geringer.

Lediglich in den untersuchten Wildscheinen wurden an den Loci für TNFRSF12A und NRAMP1 mehr unterschiedliche Allele als in der Verbraucherstudie identifiziert.

Bei der globalen Analyse des Genpools aller Kohorten über alle Marker konnte gezeigt werden, dass der Genpool der einzelnen Kohorten jeweils einen Teil des Genpools der Verbraucherstudie ausmacht.

Zusätzliche Allele, die eine systematische Abweichung vom Genpool der Verbraucherstudie darstellen, wurden nur in den untersuchten Wildschweinen, Schwäbisch-Hällischen Schweinen und den Hampshire Tieren der BHZP beobachtet. Beim statistischen Vergleich der einzelnen Allelverteilungen an allen 12 Markerloci mit der Allelverteilung in der Verbraucherstudie zeigte sich, dass sich der Genpool der Wildschweine und der untersuchten Hampshire Tiere am deutlichsten von dem Genpool des derzeit konsumierten Schweinefleisches unterscheidet. An allen 12 Markerloci wurden signifikante Unterschiede beobachtet.

4.3 Genotyp-Phänotyp Analyse über die Schweinerassen

Aus Zeitgründen konnte im Rahmen dieser Arbeit noch keine Assoziationsstudie durchgeführt werden, um Marker- bzw. Genloci zu identifizieren, die mit der unterschiedlichen Suszeptibilität der in den Infektionsversuchen verwendeten Rassen in Zusammenhang stehen.

In den folgenden Abschnitten werden die bisherigen Ergebnisse der genetischen Untersuchungen und die Ergebnisse aus den Infektionsversuchen für die einzelnen Rassen zusammengefasst.

4.3.1 Die Deutsche Landrasse

Bei den für diese Arbeit untersuchten Deutsche Landrasse Tieren handelt es sich um eine Zuchtlinie des Zuchtverbandes BHZP. Die Linie wird eingesetzt zur Erzeugung von Hybridsauen für die Mastschweinzucht.

Aus den Infektionsversuchen an der Tierärztlichen Hochschule Hannover mit *A. pleuropneumoniae*, einem der Hauptpathogene hinsichtlich der Auslösung von Pneumonien beim Schwein, standen für 35 Tiere aus 11 Familien Rankingwerte zur Verfügung, anhand derer der Schweregrad der Erkrankung nach Infektion beurteilt werden konnte.

Für die vorliegende Arbeit wurden bislang 25 dieser Tiere (aus 7 Familien), sowie die die zugehörigen Elterntiere, bestehend aus 6 Sauen und 5 Ebern, an 12 ausgewählten Markerloci genotypisiert, die potentiell die Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* beeinflussen.

Die Auswertung der Infektionsversuchsdaten ergab, dass die untersuchten Tiere dieser Linie im Mittel im Vergleich mit den anderen drei untersuchten Linien die zweithöchste Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* zeigten. Die Betrachtung der Rohdaten zeigt jedoch auch, dass die vier am schwersten erkrankten Tiere in allen Versuchen aus zwei Familien der Deutschen Landrasse stammten und diese Würfe auch Tiere beinhalteten, die nur mild erkrankt waren. Die untersuchten Tiere der Deutschen Landrasse zeigten somit die größte Varianz innerhalb der Würfe hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung der einzelnen Ferkel.

Anhand der als Balkendiagramme dargestellten Allelverteilungen innerhalb der untersuchten Landrasseferkel an den 12 Markerloci wird deutlich, dass die Allelvielfalt im Vergleich mit der als Referenz dienenden Verbraucherstudie an allen Loci deutlich reduziert ist.

Jedoch wurden bei der globalen Analyse des gesamten Genpools der Deutschen Landrasse über alle Loci gezeigt, dass die Allelvielfalt innerhalb der untersuchten Tiere zwar geringer ist, aber alle beobachteten Allele Teil des Genpools des derzeit konsumierten Schweinefleisches sind.

Für den Vergleich der Allelverteilungen der zugehörigen Elterntiere an jedem Einzellocus mit der Verbraucherstudie ergaben sich nur hochsignifikante Unterschiede an den Markerloci für CD95, Transferrin und IFNAR1/IFNGR2, bei Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur für 7 Tests.

Die Auswertung des Heterozygotietests der Elterntiere ergab signifikante Unterschiede an den Loci für CD95 und IFNAR1/IFNGR2 zwischen dem Erwartungswert und den realen Beobachtungszahlen, d.h. an diesen Loci wurden mehr homozygote Tiere beobachtet als erwartet. Am Transferrinlocus gab es keine signifikanten Abweichungen für die Elterntiere zwischen den Beobachtungszahlen und den Erwartungswerten für homo- bzw heterozygote Tiere. Auch an den übrigen 8 untersuchten Loci gab es keine Abweichungen vom Sollwert, d.h. die Tiere

verhalten sich an 9 von 11 Markerloci wie bei unverwandten Tieren erwartet. Deshalb wurden die Tiere als weitgehend unverwandt eingestuft.

Die Betrachtung der Genotypisierungsrohdaten der Elterntiere und ihrer Ferkel an den Loci für CD95 und IFNAR1/IFNGR2 zeigt, dass an beiden Loci jeweils ein Allel überrepräsentiert ist. Die Ursachen dieses auffälligen Befundes kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Möglich ist, dass es im Verlauf der Mastschweinzucht zufällig zu einer Anreicherung homozygoter Tiere an diesen Loci kam (Gendrift), die auf den ersten Blick allerdings nicht in Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung nach *A. pleuropneumoniae* Infektion stehen, da sich an beiden Loci homozygote Tiere für die jeweils angereicherten Allele finden, die sowohl mild als auch schwer erkrankt sind.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Anreicherung von Allelen an potentiellen Resistenzloci indirekt durch Selektion zustande kam, da die hier untersuchten Resistenzloci eventuell in der Nähe von Loci liegen, die einen Einfluss auf Merkmale haben, auf die die Tiere im Moment selektiert werden, wie z.B. hohe Fruchtbarkeit, gute Fleischqualität und reduzierte Stressanfälligkeit. Eine gezielte Selektion auf Resistenz wird derzeit noch nicht durchgeführt und die für die Mastschweinzucht verwendeten Tiere unterliegen auch keinem natürlichen Selektionsdruck auf Fitness, da sie unter pathogenfreien Bedingungen gehalten werden

4.3.2 Pietrain

Bei den für diese Arbeit untersuchten Pietrain Tieren handelt es sich ebenfalls um eine Zuchtlinie des Zuchtverbandes BHZP. Die Eber dieser Linie werden sowohl eingesetzt zur Erzeugung von Hybridebern für die Mastschweinzucht als auch als Endprodukteber.

Aus den Infektionsversuchen an der Tierärztlichen Hochschule Hannover standen für 28 Tiere aus 18 Familien Rankingwerte zur Verfügung, anhand derer der Schweregrad der Erkrankung nach Infektion beurteilt werden konnte.

Für die vorliegende Arbeit wurden alle 28 Tiere, sowie soweit vorhanden die zugehörigen Elterntiere, bestehend aus 13 Sauen und 13 Ebern, an den 12 ausgewählten Markerloci genotypisiert.

Die Auswertung der Infektionsversuchsdaten ergab, dass die untersuchten Tiere dieser Linie im Mittel im Vergleich mit den anderen drei untersuchten Linien die höchste Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* zeigten.

Auch die Pietrain Tiere zeigten an allen 11 untersuchten Loci im Vergleich zu der Verbraucherstudie eine deutlich geringere Alleldiversität. Allerdings konnte auch für diese Linie mittels der globalen Genpoolanalyse über alle Loci gezeigt werden, dass die Allele, die beobachtet wurden, auch ein Teil des Genpools der Verbraucherstudie sind.

Der Vergleich der Allelverteilungen der Elterntiere an jedem Einzelmarkerlocus mit der Verbraucherstudie ergab hochsignifikante Unterschiede an den Loci für CD95, TLR4 und TNF α/β . Sowohl der Oberflächenrezeptor CD95 als auch die Cytokine Tumornekrosefaktor alpha und beta spielen eine wesentliche Rolle bei der Induktion von Apoptose. Der Toll-like-Rezeptor 4 erkennt Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien und aktiviert nachfolgend das angeborene Immunsystem.

Die Betrachtung der Balkendiagramme für die Allelverteilungen der Ferkel an den drei Loci zeigt, dass am Locus für CD95 zwei Allele besonders häufig vorkommen und am Locus für TLR4 ein Allel überrepräsentiert ist. Diese Anreicherung scheint allerdings auf den ersten Blick nicht in Zusammenhang zu stehen mit dem Schweregrad der Erkrankung der Tiere. Am Locus für TNF α/β zeigen sich in der Allelverteilung der Ferkel keine Auffälligkeiten im Vergleich zu der Verteilung in der Verbraucherstudie.

Der Heterozygotietest der Elterntiere ergab tendenziell signifikante Abweichungen zwischen Soll- und Beobachtungszahlen für homo- bzw. heterozygote Tiere an den Loci für Transferrin und TNFRSF12A. Am Transferrinlocus wurden mehr heterozygote Tiere beobachtet als erwartet, was, wie zuvor erwähnt, wahrscheinlich auf Genotypisierungsfehler zurückzuführen ist und somit keine biologische Bedeutung hat. Am Locus für TNFRSF12A, wurden sowohl bei den Eltern als auch bei den Ferkeln eine signifikant erhöhte Anzahl homozygoter Tiere für ein Allel beobachtet. Allerdings ist auch in diesem Fall bei einer ersten Betrachtung der zugehörigen Rankingwerte kein Zusammenhang zwischen dem homozygot vorliegenden Allel und dem Schweregrad der Erkrankung festzustellen. Es gibt

sowohl mild als auch schwer erkrankte Pietrain Ferkel, die an dem TNFRSF12A Locus für dieses Allel homozygot sind. Vermutlich ist auch diese Anreicherung wie auch bei den Deutsche Landrasse Tieren ein Nebeneffekt von derzeit angewendeten Selektionsverfahren bei der Mastschweinzucht oder eine zufällige Gendrift.

Da sich die Pietrain Eltern an 9 von 11 Markerloci wie eine Outbred-Population verhalten, wurden auch diese Tiere als weitgehend unverwandt eingestuft.

4.3.3 Hampshire

Auch bei den für diese Arbeit untersuchten Hampshire Tieren handelt es sich um eine Zuchtlinie des Zuchtverbandes BHZP. Die Eber dieser Linie werden eingesetzt zur Erzeugung von Hybridebern für die Mastschweinzucht.

Aus den Infektionsversuchen an der Tierärztlichen Hochschule Hannover standen für 21 Tiere aus 12 Familien Rankingwerte zur Verfügung, anhand derer der Schweregrad der Erkrankung nach Infektion beurteilt werden konnte.

Für die vorliegende Arbeit wurden alle 21 Tiere, sowie soweit vorhanden die zugehörigen Elterntiere, bestehend aus 11 Sauen und 10 Ebern, an den 12 ausgewählten Markerloci genotypisiert.

Die Auswertung der Infektionsversuchsdaten ergab, dass die untersuchten Tiere dieser Linie im Mittel im Vergleich mit den anderen drei untersuchten Linien die geringste Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* zeigten.

Die untersuchten Hampshire Tiere zeigten in den genetischen Untersuchungen die auffälligsten Befunde. Auch in dieser Population wurde im Vergleich zu der Verbraucherstudie eine extreme Allelverarmung an allen 12 Loci beobachtet. Aber im Gegensatz zu den Deutsche Landrasse und Pietrain Tieren wurden bei den Hampshire Tieren auch Allele beobachtet, die in der Verbraucherstudie nicht aufgetreten sind, und zwar jeweils ein Allel an den Loci für CD95, IFNAR1/IFNGR2 und TLR4.

Der Vergleich der Allelverteilungen der zugehörigen Elterntiere an jedem Einzelmarkerlocus mit der Verbraucherstudie ergab hochsignifikante Unterschiede in den Allelverteilungen an allen 12 Markerloci im Vergleich mit der Verbraucherstudie.

Der Heterozygotietest der Elterntiere ergab hochsignifikante Abweichungen zwischen Soll- und Beobachtungszahlen für homo- bzw. heterozygote Tiere an den Loci für

TLR4 und CXCR2. Bei CXCR2 handelt es sich um einen Chemokinrezeptor für Interleukin 8. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt die Migration von neutrophilen Granulozyten zu Inflammationsorten. Der Toll-like-Rezeptor 4 erkennt Lipopolysaccharide von gram-negativen Bakterien und aktiviert nachfolgend das angeborene Immunsystem.

An diesen Loci wurden mehr homozygote Tiere beobachtet als erwartet. Die Betrachtung der Allelverteilungen anhand der Balkendiagramme der zugehörigen Ferkel an den beiden Loci zeigt, dass auch die Ferkel an beiden Loci für ein einziges Allel homozygot sind, bis auf eine Einzelbeobachtung eines weiteren Allels am TLR4 Locus.

Der Heterozygotietest der Elterntiere ergab weiterhin tendenziell signifikante Abweichungen zwischen Soll- und Beobachtungswerten für homo- bzw. heterozygote Tiere an den Loci für Transferrinrezeptor 2, IFNGR1 und IFNAR1/IFNGR2. Somit verhalten sich die Elterntiere an fünf von 11 untersuchten Markerloci nicht wie eine Outbred-Population. Deshalb wurden diese Tiere als in höherem Maße verwandt eingestuft als die Elterntiere der Deutschen Landrasse und der Pietrain Ferkel.

Am Locus für Transferrinrezeptor 2 wurden auch bei den zugehörigen Ferkeln nur zwei Allele beobachtet, wobei ein Allel deutlich überrepräsentiert war, d.h. auch die meisten Ferkel sind an diesem Locus für ein Allel homozygot.

Am Locus für IFNAR1/IFNGR2 wurde bei den Ferkeln ein Allel besonders häufig beobachtet, das weder bei den Deutsche Landrasse Tieren und den Pietrain Tieren noch in der Verbraucherstudie beobachtet wurde.

Am Locus für IFNGR1 treten bei den Ferkeln zwei Allele gehäuft auf.

Der Heterozygotieindex für die Ferkel an den drei Loci wurde nicht berechnet, da jeweils nur 12 unabhängige Tiere typisiert wurden.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse stark darauf hin, dass die untersuchten Hampshire Tiere der BHZP in größerem Maße ingezüchtet wurden als die Deutsche Landrasse Tiere und die Pietrain Tiere.

Die Anreicherung einzelner Allele an den untersuchten Loci bzw. der hohe Homozygotiegrad der Tiere sind wahrscheinlich auf einen sogenannten „Founder-

Effekt“ zurückzuführen, da alle derzeit an der BHZP gehaltenen Tiere auf nur wenige Ausgangstiere zurückgehen. Wie auch bei den anderen Linien wird wahrscheinlich außerdem eine zufällige Anreicherung einiger Markerallele im Zuge von Selektionsverfahren auf andere Merkmale stattgefunden haben. Im Unterschied zu den anderen beiden Linien scheinen sich die Auswirkungen beider Effekte (indirekte Selektion und Gendrift) an den untersuchten Markerloci jedoch bereits deutlicher zu zeigen.

Zu diesem Zeitpunkt lassen sich zwar noch keine Allele benennen, die mit der reduzierten Suszeptibilität dieser Linie assoziiert sind, aber insgesamt scheint die Allelverarmung dieser Linie einen Vorteil hinsichtlich ihrer Infektionsresistenz gegenüber *A. pleuropneumoniae* zu bringen.

4.3.4 Large White

Für 16 Tiere aus 12 Familien (mit 9 Sauen und 7 Ebern) der Large White Linie der BHZP liegen Informationen zu dem Schweregrad der Erkrankung nach Infektion mit *A. pleuropneumoniae* vor.

Die Auswertung der Infektionsversuchsdaten ergab, dass die untersuchten Tiere dieser Linie im Mittel im Vergleich mit den anderen drei untersuchten Linien hinsichtlich ihrer Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* zwischen den Hampshire und den Deutsche Landrasse Tieren lagen.

Für diese Tiere konnten im Rahmen dieser Arbeit noch keine Genotypisierungsdaten erhoben werden.

4.3.5 Vergleich der Genpools der für die Infektionsversuche verwendeten Rassen untereinander

Bislang wurden zwar noch keine statistischen Vergleiche der Allelverteilungen der für die Infektionsversuche verwendeten Rassen angestellt, da die Genotypisierungsarbeiten für die Large White Tiere noch nicht abgeschlossen sind, aber der Vergleich der Allelverteilungen zwischen den untersuchten Ferkel der Rassen Deutsche Landrasse, Pietrain und Hampshire an den 12 ausgewählten Markerloci anhand der Balkendiagramme zeigt bereits deutliche Unterschiede

zwischen den Rassen. Allen drei Rassen ist eine allgemeine Allelverarmung im Vergleich zu der Verbraucherstudie, also dem Genpool des zur Zeit konsumierten Schweinefleisches in Deutschland, gemeinsam.

Der statistische Vergleich der Allelverteilungen der Elterntiere mit der Verbraucherstudie zeigte für die Hampshire Tiere an allen Loci hochsignifikante Unterschiede, für die Pietrain Tiere an den Loci für CD95, TLR4 und TNF α/β und für die Deutsche Landrasse Tiere an den Loci für CD95, Transferrin und IFNAR1/IFNGR2. Dies ist ein indirekter Beweis dafür, dass sich auch die Allelverteilungen zwischen den Rassen unterscheiden, andernfalls hätten die Vergleiche mit der Verbraucherstudie für alle drei Rassen dieselben Ergebnisse bringen müssen.

Auch die Auswertung des Heterozygotietests der Elterntiere zeigte für alle drei Rassen eine Anreicherung homozygoter Tiere an unterschiedlichen Loci.

Bei den Deutsche Landrasse Tieren zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an homozygoten Tieren an den Loci für CD95 und IFNAR1/IFNGR2, bei den Pietrain Tieren zeigte sich eine tendenziell signifikant erhöhte Anzahl an homozygoten Tieren am Locus für TNFRSF12A und bei den Hampshire Tieren an den Loci für Transferrinrezeptor 2, TLR4, IFNGR1, IFNAR1/IFNGR2 und CXCR2.

Das bedeutet, auch bei dieser Untersuchung sind für alle drei Rassen andere Loci auffällig, lediglich am Markerlocus für IFNAR1/IFNGR2 treten sowohl bei der Deutschen Landrasse als auch bei den Hampshire Tieren mehr homozygote Tiere auf als bei unverwandten Tieren erwartet. Die Betrachtung der Rohdaten zeigt allerdings, dass die untersuchten Tiere für zwei unterschiedliche Allele an diesem Locus homozygot sind.

4.4 Fazit und Ausblick

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die untersuchten Schweinelinien Deutsche Landrasse, Pietrain und Hampshire sowohl in ihrem Genpool an den untersuchten 12 potentiellen Resistenzloci als auch hinsichtlich ihrer Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae* unterscheiden.

Besonders auffällig waren die Hampshire Tiere, deren genetische Andersartigkeit assoziiert zu sein scheint mit reduzierter Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *A. pleuropneumoniae*.

In einem nächsten Schritt müssten weitere Hampshire Tiere anderer Zuchtverbände genotypisiert werden, um zu überprüfen, ob diese eine ähnliche Allelverarmung zeigen, oder ob dies eine Besonderheit der Tiere der BHZP ist.

Desweiteren müssten weitere Infektionsversuche durchgeführt werden mit anderen *A. pleuropneumoniae* Serotypen, um zu überprüfen, ob die Hampshire Tiere auch dann eine verminderte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion zeigen.

Auf Basis der bisherigen Ergebnisse wird ein Hauptziel der zukünftigen Arbeiten die Identifizierung derjenigen Loci sein, die die unterschiedliche Suszeptibilität der Rassen gegenüber Atemwegserkrankungen beeinflussen.

Mittels FAMHAP-Analyse wird zunächst ein Vergleich der Genotypen aller vier verwendeter Rassen an den 12 ausgewählten Markerloci angestellt werden, um die offensichtlichen Unterschiede in ihrem Genpool statistisch zu belegen.

Der nächste Schritt ist der Vergleich der Genotypen von mild und schwer erkrankten Tieren nach Infektion mit *A. pleuropneumoniae* unabhängig von ihrer Rasse.

Im Idealfall wäre das Ergebnis dieser Analysen, dass sich die Unterschiede zwischen der hochsuszeptibeln Pietrain-Linie und der wenig suszeptiblen Hampshire-Linie an denselben Loci zeigen, an denen sich auch die Tiere mit mildem und schwerem Krankheitsverlauf nach *A. pleuropneumoniae* Infektion unterscheiden.

Der nächste Schritt wäre die vergleichende Sequenzierung jeweils homozygoter Tiere für ein Allel, das assoziiert ist mit einer verminderten Suszeptibilität und von Tieren, die ein Allel tragen, das mit einer erhöhten Suszeptibilität assoziiert ist.

Anhand der Sequenzierungsdaten könnten dann SNPs identifiziert werden, in denen sich die Tiere unterscheiden, um anschließend eine Haplotypenanalyse durchzuführen.

Dadurch könnte der genomische Bereich, der für die Assoziation verantwortlich ist, weiter eingegrenzt werden und eventuell sogar die kausale Mutation, die für eine verminderte Suszeptibilität der Schweine gegenüber Atemwegserkrankungen verantwortlich ist, identifiziert werden.

Langfristiges Ziel des Projektes ist die Entwicklung eines Gentests, mit dessen Hilfe in Zuchtprogrammen gezielt Ferkel für die Mastschweinzucht ausgewählt werden können, die eine reduzierte Suszeptibilität gegenüber Atemwegserkrankungen zeigen. Damit könnte auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit ein Beitrag zur Verbesserung der Tiergesundheit geleistet werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Acevedo-Whitehouse K, Vicente J, Gortazar C, Höfle U, Fernández-de-Mera IG, Amos W. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Mol. Ecol.* **14** (10): 3209-17 (2005)
2. Aichele D, Schnare M, Saake M, Röllinghoff M, Gessner A. Expression and antimicrobial function of bactericidal permeability-increasing protein in cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* **74**(8): 4708-14 (2006)
3. Altrock AV: Untersuchungen zum Vorkommen bakterieller Infektionserreger in pathologisch-anatomisch veränderten Lungen von Schweinen und Zusammenstellung der Resistenzspektren. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **111**: 164-172 (1998)
4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**(3): 403-10 (1990)
5. Anmarkrud JA, Kleven O, Bachmann L, Lifjeld JT. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evol. Biol.* **8**: 138 (2008)
6. Amaral AJ, Megens HJ, Crooijmans RP, Heuven HC, Groenen MA. Linkage disequilibrium decay and haplotype block structure in the pig. *Genetics* **179** (1): 569-79 (2008)
7. Anderson DS, Adhikari P, Weaver KD, Crumbliss AL, Mietzner TA. The Haemophilus influenzae hFbpABC Fe³⁺ transporter: Analysis of the membrane permease and development of a gallium-based screen for mutants. *J. Bacteriol.* **189** (14): 5130-41
8. Anderson SI, Lopez-Corrales NL, Gorick B and Archibald AL. A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mammalian Genome* **11**: 811-814. (2000)
9. Baarsch MJ, Scamurra RW, Burger K, Foss DL, Maheswaran SK, Murtaugh MP. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. *Infect. Immun.* **63**(9): 3587-95 (1995)
10. Balaji R, Wright KJ, Turner JL, Hill CM, Dritz SS, Fenwick B, Carroll JA, Zannelli ME, Beausang LA, Minton JE. Circulating cortisol, tumor necrosis factor-alpha interleukin-1beta, and interferon-gamma in pigs infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. *J. Anim. Sci.* **80**: 202-207 (2002)
11. Baldwin GS, Weinstock J. Nucleotide sequence of porcine liver transferrin. *Nucleic Acids Res.* **16**(17): 8720 (1988)
12. Baltés N, Tonpitak W, Gerlach GF, Hennig-Pauka I, Hoffmann-Moujahid A, Ganter M, Rothkötter HJ. Actinobacillus pleuropneumoniae iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. *Infect. Immun.* **69**(1): 472-8 (2001)
13. Baltés N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF. Both transferrin binding proteins are virulence factors in Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 7 infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**(2): 283-7 (2002)

14. Barton CH, Biggs TE, Baker ST, Bowen H, Atkinson PG. Nramp1: a link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens. *J. Leukoc. Biol.* **66**(5): 757-62 (1999)
15. Beck S, Pohl FM. DNA sequencing with direct blotting electrophoresis. *EMBO J.* **3**(12): 2905-9 (1984)
16. Becker T, Knapp M. Maximum-likelihood estimation of haplotype frequencies in nuclear families. *Genet. Epidemiol.* **27**(1): 21-32 (2004)
17. Benecke N. Der Mensch und seine Haustiere. Die Geschichte einer jahtausendealten Beziehung. Stuttgart: Theiss 1994
18. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **27**(2): 573-80 (1999)
19. Böddecker I., Ziegler A (2000): Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenen. *Dtsch. Med. Wschr.* **125**, 810-815 (2000)
20. Boekema BK, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE, Kamp EM, van Putten JP, Verheijden JH. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Vet. Microbiol.* **93**(2): 133-44 (2003)
21. Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Kroll JS, Langford PR. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* **4**: 225-235 (2002)
22. Boyle MP. Strategies for identifying modifier genes in cystic fibrosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**(1): 52-7 (2007)
23. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**(3): 314-31 (1980)
24. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell.* **68**(4): 799-808 (1992)
25. Zhao Z, Burkly LC, Campbell S, Schwartz N, Molano A, Choudhury A, Eisenberg RA, Michaelson JS, Putterman C. TWEAK/Fn14 interactions are instrumental in the pathogenesis of nephritis in the chronic graft-versus-host model of systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* **179**(11): 7949-58 (2007)
26. Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat. Immunol.* **7**(10): 1074-81 (2006)
27. Ceccarelli AV, Cole AM, Park AK, Tahk S, Yoshioka D, Ganz T. Therapeutic effect of a pig-derived peptide antibiotic on porcine wound infections. *Comp. Med.* **51** (1): 75-9 (2001)
28. Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**(3): 1041-6 (1997)

29. Chen K, Baxter T, Muir WM, Groenen MA, Schook LB. Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). *Int. J. Biol. Sci.* **3**(3): 153-65 (2007)
30. Clamp PA, Feltes R, Shalhevet D, Beever JE, Atac E, Schook LB. Linkage relationships between ALPL, ENO1, GPI, PGD, and TGFB1 on porcine chromosome 6. *Genomics* **17**(2): 324-9 (1993)
31. Comberg G. Die deutsche Tierzucht im 19. Und 20. Jahrhundert. Stuttgart: Ulmer 1984
32. Couillault C, Pujol N, Reboul J, Sabatier L, Guichou JF, Kohara Y, Ewbank JJ. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat. Immunol.* **5**(5): 488-94 (2004)
33. Crawley A, Wilkie BN. Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics. *Vaccine* **21**(21-22): 2911-22 (2003)
34. Cruijisen T, van Leengoed LA, Kamp EM, Bartelse A, Korevaar A, Verheijden JH. Susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs from an endemically infected herd is related to the presence of toxin-neutralizing antibodies. *Vet. Microbiol.* **47**(3-4): 219-28 (1995)
35. Danilowicz E, Martinez-Arias R, Singh M, Probst I, Stanke F, Tümmler B, Höltig D, Waldmann KH, Gerlach GF, Leeb T and the FUGATO-consortium IRAS: Characterization of the porcine transferrin gene (TF) and its association with susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. (Manuskript in Vorbereitung)
36. Demars J, Riquet J, Fève K, Gautier M, Morisson M, Demeure O, Renard C, Chardon P, Milan D. High resolution physical map of porcine chromosome 7 QTL region and comparative mapping of this region among vertebrate genomes. *BMC Genomics* **7**:13 (2006)
37. Ding XD, Simianer H, Zhang Q. A new method for haplotype inference including full-sib information. *Genetics* **177**(3): 1929-40 (2007)
38. Dolan CV, Boomsma DI. Optimal selection of sib pairs from random samples for linkage analysis of a QTL using the EDAC test. *Behav. Genet.* **28**(3): 197-206 (1998)
39. Done SH. Environmental factors affecting the severity of pneumonia in pigs. *Vet. Rec.* **128**: 582-586 (1991)
40. Done SH, Paton DJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet. Rec.* **136**: 32-35 (1995)
41. Du FX, Clutter AC, Lohuis MM. Characterizing linkage disequilibrium in pig populations. *Int. J. Biol. Sci.* **3**(3): 166-78 (2007)
42. Eaves L, Meyer J. Locating human quantitative trait loci: guidelines for the selection of sibling pairs for genotyping. *Behav. Genet.* **24**(5): 443-55 (1994)
43. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **12**(2): 241-53 (1992)

44. Elahi S, Buchanan RM, Attah-Poku S, Townsend HG, Babiuk LA, Gerdtts V. The host defense peptide beta-defensin 1 confers protection against *Bordetella pertussis* in newborn piglets. *Infect. Immun.* **74** (4): 2338-52 (2006)
45. Ellegren H, Johansson M, Chowdhary BP, Marklund S, Ruyter D, Marklund L, Bräuner-Nielsen P, Edfors-Lilja I, Gustavsson I, Juneja RK, et al. Assignment of 20 microsatellite markers to the porcine linkage map. *Genomics* **16**(2): 431-9 (1993)
46. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* **5**(6):435-45 (2004)
47. Erlich HA, Arnheim N. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 479-506 (1992)
48. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden. Study links genetic polymorphism to susceptibility to HIV infection. *Eurosurveillance* **13**(29): 18933 (2008)
49. Evans GJ, Giuffra E, Sanchez A, Kerje S, Davalos G, Vidal O, Illán S, Noguera JL, Varona L, Velander I, Southwood OI, de Koning DJ, Haley CS, Plastow GS, Andersson L. Identification of quantitative trait loci for production traits in commercial pig populations. *Genetics* **164**: 621-627 (2003)
50. Ewen KR, Bahlo M, Treloar SA, Levinson DF, Mowry B, Barlow JW, Foote SJ. Identification and analysis of error types in high-throughput genotyping. *Am. J. Hum. Genet.* **67**(3): 727-36 (2000)
51. Fenwick B, Henry S. Porcine pleuropneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **37**: 85-100 (1994)
52. Fenwick B. Relationship between vaccination and management in assuring profitable pork production. *Anim. Health Res. Rev.* **5**: 267-269 (2004)
53. Frengen E, Thomsen P, Kristensen T, Kran S, Miller R, Davies W. Porcine SINES: characterization and use in species-specific amplification. *Genomics* **10**(4): 949-56 (1991)
54. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* **67**(6): 1047-58 (1991)
55. Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochem Soc Trans.* **36**(Pt 6): 1461-6 (2008)
56. Gerlach GF, Rehm T. FUGATO-Verbundprojekt IRAS. *GenomXpress* **2**: 18-20 (2007)
57. Gerstlauer E. Verändertes Rassenbild in der Schweinezucht. Abschlussarbeit, FH Weihenstephan, Abt. Triesdorf, Fachgebiet Tierzucht 1979
58. Goureau A, Yerle M, Schmitz A, Riquet J, Milan D, Pinton P, Frelat G, Gellin J. Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. *Genomics* **36**(2): 252-62 (1996)
59. Gregor G., Leucht W: Bedeutung, Zucht und Eigenschaften des Miniaturschweines. *Fortschrittsberichte für die Landwirtschaft und Nahrungsgüterwirtschaft. Akad. Landw.wissensch.* **14**(5/6) (1976)

60. Gross-Bellard M, Oudet P, Chambon P. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **36**(1): 32-8 (1973)
61. Gudmundsson GH, Magnusson KP, Chowdhary BP, Johansson M, Andersson L, Boman HG. Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene family member: comparative mapping of the locus for the human peptide antibiotic FALL-39. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**(15): 7085-9 (1995)
62. Hamada H. & Kakunaga T. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* **298**:396-98. (1982)
63. Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T, Seidman M, Stollar BD. Characterization of genomic poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequences: structure, organization, and conformation. *Mol. Cell. Biol.* **4**(12): 2610-21 (1984)
64. Hannan PC, Bhogal BS, Fish JP. Tylosin tartrate and tiamulin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Res. Vet. Sci.* **33**: 76-88 (1982)
65. Hege R, Zimmermann W, Scheidegger R, Stärk KD. Incidence of reinfections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig farms located in respiratory-disease-free regions of Switzerland--identification and quantification of risk factors. *Acta Vet. Scand.* **43**: 145-156 (2002)
66. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3**(2): 196-200 (2002)
67. Hennig-Pauka I, Ganter M, Gerlach GF, Rothkötter HJ. Enzyme activities, protein content and cellular variables in the pulmonary epithelial lining fluid in selected healthy pigs. *J. Vet. Med. A* **48**: 631-639 (2001)
68. Hennig-Pauka I, Jacobsen I, Blecha F, Waldmann KH, Gerlach GF. Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vet. Res.* **5**: 267-269 (2006)
69. Hennig-Pauka I, Bremerich S, Nienhoff H, Schröder C, Verspohl J, Strutzberg-Minder K, Ganter M, Waldmann KH, Blecha F, Beyerbach M, Gerlach GF. Respiratory disease markers in porcine bronchoalveolar lavage fluid. *J Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **54** (8): 434-40 (2007)
70. Höltig D. Vergleichende klinische Untersuchungen an Ferkeln der Rassen Deutsche Landrasse, Hampshire, Pietrain und Large White hinsichtlich unterschiedlicher Erkrankungsgrade nach einer Aerosolinfektion mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Dissertation 2008)
71. Höltig D, Hennig-Pauka I, Thies K, Rehm T, Gerlach GF, Waldmann KH. Vergleich der diagnostischen Aussagekraft klinischer, röntgenologischer und sonographischer Befunde bei der experimentellen Infektion des Schweines mit *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **121**(11/12) (2008, in Druck)

72. Höltig D, Hennig-Pauka I, Thies K, Rehm T, Beyerbach M, Gerlach GF, Waldmann KH. Clinical analysis of distinct susceptibilities to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection within different porcine breeding lines. (in Druck, 2008)
73. Humphray SJ, Scott CE, Clark R, Marron B, Bender C, Camm N, Davis J, Jenks A, Noon A, Patel M, Sehra H, Yang F, Rogatcheva MB, Milan D, Chardon P, Rohrer G, Nonneman D, de Jong P, Meyers SN, Archibald A, Beever JE, Schook LB, Rogers J. A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biol.* **8**(7): R139 (2007)
74. Jilizi A, Edouard J, Fadhlouzi-Zid K, Frigi S, Debré P, Slim A, Theodorou I, El Gaaied AB, Carpentier W. Identification of the CCR5-Delta32 HIV resistance allele and new mutations of the CCR5 gene in different Tunisian populations. *Hum. Immunol.* **68**(12): 993-1000 (2007)
75. Johansson M, Ellegren H, Andersson L. Comparative mapping reveals extensive linkage conservation--but with gene order rearrangements--between the pig and the human genomes. *Genomics* **25**(3): 682-90 (1995)
76. Jørgensen CB, Cirera S, Anderson SI, Archibald AL, Raudsepp T, Chowdhary B, Edfors-Lilja I, Andersson L, Fredholm M. Linkage and comparative mapping of the locus controlling susceptibility towards E. COLI F4ab/ac diarrhoea in pigs. *Cytogenet. Genome Res.* **102**(1-4): 157-62 (2003)
77. Klein W, Tromm A, Folwaczny C, Hagedorn M, Duerig N, Epplen J, Schmiegel W, Griga T. A polymorphism of the bactericidal/permeability increasing protein (BPI) gene is associated with Crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**(4): 282-3 (2005)
78. Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD, Aquadro CF. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**(18): 10774-8 (1998)
79. Kumar V. The European CF Twin and Sibling Study: Genetic Susceptibility to infectious disease. Dissertation 2007
80. Kumar V, Becker T, Jansen S, van Barneveld A, Boztug K, Wöfl S, Tümmler B, Stanke F. Expression levels of FAS are regulated through an evolutionary conserved element in intron 2, which modulates cystic fibrosis disease severity. *Genes Immun.* [in Druck] (2008)
81. Laghi L, Bianchi P, Malesci A. Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability. *Oncogene* (in Druck, 2008)
82. Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* **309** (5733): 381 (2005)
83. Larson G, Albarella U, Dobney K, Rowley-Conwy P, Schibler J, Tresset A, Vigne JD, Edwards CJ, Schlumbaum A, Dinu A, Balaşescu A, Dolman G, Tagliacozzo A, Manaseryan N, Miracle P, Van Wijngaarden-Bakker L, Masseti M, Bradley DG, Cooper A. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**(39): 15276-81 (2007)

84. Laval G, Iannuccelli N, Legault C, Milan D, Groenen MA, Giuffra E, Andersson L, Nissen PH, Jørgensen CB, Beeckmann P, Geldermann H, Foulley JL, Chevalet C, Ollivier L. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genet. Sel. Evol.* **32**(2): 187-203 (2000)
85. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* **2**(4): 275-87 (1993)
86. Leeb T, Müller M. Comparative human-mouse-rat sequence analysis of the ICAM gene cluster on HSA 19p13.2 and a 185-kb porcine region from SSC 2q. *Gene* **343**(2): 239-44 (2004)
87. Leeb T, Martins-Wess F, Kuiper H, Lassnig C, Distl O, Müller M. Molecular characterization of the porcine TYK2 gene on SSC 2q1.3-->q2.1. *Cytogenet. Genome Res.* **107**(1-2): 103-7 (2004)
88. Leeb T, Brenig B, Rohrer GA. Characterization and linkage mapping of four gene-associated porcine microsatellites. *Anim. Genet.* **36**(3): 279-80 (2005)
89. Leoratti FM, Farias L, Alves FP, Suarez-Mútiis MC, Coura JR, Kalil J, Camargo EP, Moraes SL, Ramasawmy R. Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. *J. Infect. Dis.* **198**(5): 772-80 (2007)
90. Leucht W, Gregor G, Stier H: Das Miniaturschwein. *Einführung in die Versuchstierkunde*. **Bd.4** Gustav Fischer Verlag, Jena (1982)
91. Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature* **7**: 294-304 (2006)
92. Litt M, Luty JA. A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. *Am. J. Hum. Genet.* **44**:397-401 (1989)
93. Lorenz RJ, Vollmar J. Grundbegriffe der Biometrie (1996)
94. Candidate gene microsatellite variation is associated with parasitism in wild bighorn sheep. Luikart G, Pilgrim K, Vistry J, Ezenwa VO, Schwartz MK. *Biol. Lett.* **4**(2): 228-31 (2008)
95. Martins-Wess F, Voss-Nemitz R, Drögemüller C, Brenig B, Leeb T. Construction of a 1.2-Mb BAC/PAC contig of the porcine gene RYR1 region on SSC 6q1.2 and comparative analysis with HSA 19q13.13. *Genomics* **80**(4): 416-22 (2002)
96. Martins-Wess F, Milan D, Drögemüller C, Vobeta-Nemitz R, Brenig B, Robic A, Yerle M, Leeb T. A high resolution physical and RH map of pig chromosome 6q1.2 and comparative analysis with human chromosome 19q13.1. *Genomics* **4**(1):20 (2003)
97. Mekus F. Cystic Fibrosis As A Genetically Complex Disease. Dissertation (2000)
98. Mekus F, Dörk T, Deufel T, Morral N, Tümmler B. Analysis of microsatellites by direct blotting electrophoresis and chemiluminescence detection. *Electrophoresis* **16**(10): 1886-8 (1995)
99. Mekus F, Laabs U, Veeze H, Tümmler B. Genes in the vicinity of CFTR modulate the cystic fibrosis phenotype in highly concordant or discordant F508del homozygous sib pairs. *Hum. Genet.* **112**: 1-11 (2003)

100. Mekus F, Tümmler B. Genes, environment, iron transport, and cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**: 770-771 (2004)
101. Meyers SN, Rogatcheva MB, Larkin DM, Yerle M, Milan D, Hawken RJ, Schook LB, Beever JE. Piggy-BACing the human genome II. A high-resolution, physically anchored, comparative map of the porcine autosomes. *Genomics* **86**(6): 739-52 (2005)
102. Moser RJ, Reverter A, Kerr CA, Beh KJ, Lehnert SA. A mixed-model approach for the analysis of cDNA microarray gene expression data from extreme-performing pigs after infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Anim. Sci.* **82**(5): 1261-71 (2004)
103. Mullis K.B. and Faloona F. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350 (1987)
104. Naranjo V, Ayoubi P, Vicente J, Ruiz-Fons F, Gortazar C, Kocan KM, de la Fuente J. Characterization of selected genes upregulated in non-tuberculous European wild boar as possible correlates of resistance to *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.* **116**(1-3): 224-31 (2006)
105. Nickels S. Von der Domestikation der Schweine zur Entwicklung der heutigen Rassen in Deutschland. *Broschüre Gefährdeter Schweinerassen*. <http://www.g-e-h.de/geh-schweine/11-domest.htm>
106. Niyonsaba F, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **2**(3): 224-31 (2003)
107. Ollivier L, Alderson L, Gandini GC, Foully JL, Haley C S, Joosten R, Rattink AP, Harlizius B, Groenen MAM, Amigues Y, Boscher MY, Russell G, Law A, Davoli R, Russo V, Matassino D, Desautels C, Fimland E, Bagga M, Delgado JV, Vega. Pla JL, Martinez AM, Ramos AM, Glodek P, Meyer JN, Plastow GS, Siggins KW, Archibald AL, Milan D, San Cristobal M, Laval G, Hammond K, Cardellino R, Chevalet C. An assessment of European pig diversity using molecular markers: Partitioning of diversity among breeds. *Conservation Genetics* **6**: 729-741 (2005)
108. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **7**(5): 353-64 (2007)
109. Primmer CR, Ellegren H. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* **15**(8): 997-1008 (1998)
110. Rehm T, Benga L, Danilowicz E, Drungowski M, Höltig D, Kahlisch D, Öhlmann W, Probst I, Gerlach GF et al.. Funktionelle Genomanalyse zur Resistenz gegen Atemwegsinfektionen am Beispiel der *Actinobacillus*-Pleuropneumonie des Schweins. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **115**: 260-264 (2008)
111. Reiner G. Genetics and disease resistance. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **115**(7): 252-9 (2008)
112. Rettenberger G, Klett C, Zechner U, Kunz J, Vogel W, Hameister H. Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting. *Genomics* **26**(2): 372-8 (1995)

113. Rink A, Santschi EM, Eyer KM, Roelofs B, Hess M, Godfrey M, Karajusuf EK, Yerle M, Milan D, Beattie CW. A first-generation EST RH comparative map of the porcine and human genome. *Mamm. Genome* **13**: 578-587 (2002)
114. Risch N, Zhang H. Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* **268**(5217): 1584-9 (1995)
115. Roberts LJ, Baldwin TM, Speed TP, Handman E, Foote SJ. Chromosomes X, 9, and the H2 locus interact epistatically to control *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* **29**(9): 3047-50 (1999)
116. Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB Jr, Zabner J, Prather RS, Welsh MJ. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* **321**(5897): 1837-41 (2008)
117. Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP, Beattie CW. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* **136**(1): 231-45 (1994)
118. Ross RF: Mycoplasmal diseases. In: Diseases of Swine 7th ed., eds. Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Alaire S, Taylor DJ, p.537-551. *Iowa State University Press*, Ames, IA, (1992)
119. Sacchetti L, Calcagno G, Coto I, Tinto N, Vuttariello E, Salvatore F. Efficiency of two different nine-loci short tandem repeat systems for DNA typing purposes. *Clin. Chem.* **45**(2): 178-83 (1999)
120. Sambras HH. Gefährdete Nutztierassen. Ihre Zuchtgeschichte, Nutzung und Bewahrung. Stuttgart: Ulmer 1994
121. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning – a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
122. SanCristobal M, Chevalet C, Peleman J, Heuven H, Brugmans B, van Schriek M, Joosten R, Rattink AP, Harlizius B, Groenen MA, Amigues Y, Boscher MY, Russell G, Law A, Davoli R, Russo V, Désautés C, Alderson L, Fimland E, Bagga M, Delgado JV, Vega-Pla JL, Martinez AM, Ramos M, Glodek P, Meyer JN, Gandini G, Matassino D, Siggins K, Laval G, Archibald A, Milan D, Hammond K, Cardellino R, Haley C, Plastow G. Genetic diversity in European pigs utilizing amplified fragment length polymorphism markers. *Anim. Genet.* **37**(3): 232-8 (2006)
123. Schoder G, Maderbacher R, Wagner G, Baumgartner W. Causes of losses in a pig fattening facility. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **100**(11): 428-32 (1993)
124. Schook LB, Beever JE, Rogers J, Humphray S, Archibald A, Chardon P, Milan D, Rohrer G, Eversole K. Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): A Strategic Roadmap for Sequencing The Pig Genome. *Comp. Funct. Genomics* **6** (4): 251-5 (2005)
125. Scitutto E, Martínez JJ, Huerta M, Avila R, Fragoso G, Villalobos N, de Aluja A, Larralde C. Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic

- determinants in innate and acquired resistance to infection. *Vet. Parasitol.* **116**(3): 223-9 (2003)
126. Seburya TN, Saunders JR. Haemophilus pleuropneumoniae infection in swine: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **182**: 1331-1337 (1983)
127. Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Annals of Human Genetics* **59** (Pt.1): 97-105 (1995)
128. Shinkai H, Tanaka M, Morozumi T, Eguchi-Ogawa T, Okumura N, Muneta Y, Awata T, Uenishi H. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 genes. *Immunogenetics* **58**: 324-330 (2006)
129. Sipos W, Schmoll F, Wimmers K. Selection for disease resistance in domestic ruminants and swine by indicator traits as well as marker and causal genes--a review. Part 1: Short introduction to immunogenetics of MHC and non-MHC genes and special immunogenetics of cattle and swine. *Dtsch. Tierärztl Wochenschr.* **109**(11): 470-80 (2002)
130. Stanke F, Tümmler B, Becker T. Genetic modifiers in cystic fibrosis. *N. Eng. J. Med.* **354**(1): 88-90 (2006)
131. Stanke F, Becker T, Cuppens H, Kumar V, Cassiman JJ, Jansen S, Radojkovic D, Siebert B, Yarden J, Ussery DW, Wienker TF, Tümmler B. The TNFalpha receptor TNFRSF1A and genes encoding the amiloride-sensitive sodium channel ENaC as modulators in cystic fibrosis. *Hum. Genet.* **119**(3): 331-43 (2006)
132. Steinberg DA, Hurst MA, Fujii CA, Kung AH, Ho JF, Cheng FC, Lounsbury DJ, Fiddes JC. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**(8): 1738-42 (1997)
133. Steinheuer R, Drögemüller C, Hamann H, Distl O. Possible uses of genetic markers for improving fertility and health in swine production. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **110**: 255-265 (2003)
134. Straw BE, Neubauer GD, Leman AD. Factors affecting mortality in finishing pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **183**(4): 452-5 (1983)
135. Stryer L. Biochemie, 1991, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
136. Sun HS, Wang L, Rothschild MF, Tuggle CK. Mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene to pig chromosome 15. *Anim. Genet.* **29**(2): 138-40 (1998)
137. Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4127-4138 (1984)
138. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA Markers. *Nucl. Ac. Res.* **17**:6463-6471 (1989)
139. Taylor AC, Sherwin WB, Wayne RK. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorninus krefftii*. *Mol. Ecol.* **3**(4): 277-90 (1994)
140. Thacker EL. Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* **17**(3): 551-65 (2001)

141. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**(5109): 816-9 (1993)
142. Thomas JW, Touchman JW, Blakesley RW et al.. Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. *Nature* **424**(6950): 788-93 (2003)
143. Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS, Powell K, Mortensen HM, Hirbo JB, Osman M, Ibrahim M, Omar SA, Lema G, Nyambo TB, Ghori J, Bumpstead S, Pritchard JK, Wray GA, Deloukas P. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat. Genet.* **39**(1): 31-40 (2006)
144. Torkamani A, Topol EJ, Schork NJ. Pathway analysis of seven common diseases assessed by genome-wide association. *Genomics* August 2008 (in Druck)
145. Tuovinen VK, Grohn YT, Straw BE. Farrowing unit housing and management factors associated with diseases and disease signs of importance for feeder pig quality. *Acta Agric. Scand. A* **47**: 117-125 (1997)
146. Tümmler B, Kiewitz C. Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Mol. Med. Today* **5**: 351-358 (1999)
147. Uenishi H, Shinkai H. Porcine Toll-like receptors: The front line of pathogen monitoring and possible implications for disease resistance. *Dev. Comp. Immunol.* [Epub ahead of print] (2008)
148. Ungemach FR, Müller-Bahr D, Abraham G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 33-38 (2006)
149. URL: [http:// www.g-e-h.de/](http://www.g-e-h.de/); Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V.
150. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
151. URL: http://pre.ensembl.org/Sus_scrofa/index.html
152. URL: <http://www.schweinefreunde.de/>; Schweinefreunde e.V.
153. URL: <http://www.vieh-ev.de/Rassen/schweine.html>; Vieh e.V.
154. Uthe JJ, Stabel TJ, Zhao SH, Tuggle CK, Bearson SM. Analysis of porcine differential gene expression following challenge with *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis using suppression subtractive hybridization. *Veterinary Microbiology* **114**: 60-71 (2006)
155. Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* **133**(3): 737-49 (1993)
156. Van Reeth K, Pensaert M. Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *Vet. Rec.* **135**: 594-597 (1994)
157. Van Reeth K, Van Gucht S, Pensaert M. In vivo studies on cytokine involvement during acute viral respiratory disease of swine: troublesome but rewarding. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **87**(3-4): 161-8 (2002)

158. Velthuis AG, DE Jong MC, Stockhofe N, Vermeulen TM, Kamp EM. Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs is characterized by variation in infectivity. *Epidemiol. Infect.* **129**(1): 203-14 (2002)
159. Vigre H, Dohoo IR, Stryhn H, Busch ME. Intra-unit correlations in seroconversion to *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma hyopneumoniae* at different levels in Danish multi-site pig production facilities. *Prev Vet. Med.* **63**(1-2): 9-28 (2004)
160. Vincent AL, Thacker BJ, Halbur PG, Rothschild MF, Thacker EL. An investigation of susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus between two genetically diverse commercial lines of pigs. *J. Anim. Sc.* **84**(1): 49-57 (2006)
161. Visscher AH, Janss LL, Niewold TA, de Greef KH. Disease incidence and immunological traits for the selection of healthy pigs. A review. *Vet. Q* **24**: 28-34 (2002)
162. Waldmann KH. Haltung- und managementspezifische Einflüsse auf die Gesundheit von Schweinen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **110**: 328-330 (2003)
163. Wang F, Liu D. Polymorphism of human alleles associated with genetic resistance against HIV-1 infection and its implications. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **17**(4): 285-7 (2000)
164. Wang Y, Ren J, Lan L, Yan X, Huang X, Peng Q, Tang H, Zhang B, Ji H, Huang L. Characterization of polymorphisms of transferrin receptor and their association with susceptibility to ETEC F4ab/ac in pigs. *J Anim Breed Genet.* **124** (4): 225-9 (2007)
165. Weber J.L., May P. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* **44**:388-396 (1989)
166. Weber JL Informativeness of human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* **7**:524-530 (1990)
167. Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* **2**(8):1123-1128 (1993)
168. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**(7145): 661-78
169. Wensvoort G. Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet. Res.* **24**: 117-124 (1993)
170. Wilke K, Jung M, Chen Y, Geldermann H. Porcine (GT)_n sequences: structure and association with dispersed and tandem repeats. *Genomics* **21**: 63-70 (1994)
171. Winterø AK, Fredholm M, Thomsen PD. Variable (dG-dT)_n·(dC-dA)_n sequences in the porcine genome. *Genomics* **12**(2): 281-8 (1992)
172. Wolz W. Anwendung von Mikrosatelliten als genetische Marker. Diplomarbeit an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institut für Humangenetik (1993)
173. Yasue H, Kitajima M, Tamada Y, Rezaeian AH, Hiraiwa H, Hayashi T, Shimogiri T. Assignment of 115 genes from HSA9 and HSA14 to SSC1q by RH mapping to generate a dense human-pig comparative map. *Anim. Genet.* **39**(3): 301-5 (2008)
174. Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion (ZDS): Zahlen aus der deutschen Schweineproduktion 1995. Bonn: ZDS 1996

175. Zhao C, Ganz T, Lehrer RI. Structures of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptides: prophenin-2 and PR-39. *FEBS Lett.* **376**(3): 130-4 (1995)
176. Ziegler A. Epidemiologie-Gegenwart und Zukunft. *Dtsch. Ärzteblatt* **36**: 2342-2346 (2002)
177. Zoologisches Museum der Universität Zürich: Ausstellung Schweine. Eine Ausstellung über Zoologie, Domestikation, Rassenbildung, Haltung, kulturelle und wirtschaftliche Bedeutung der Schweine. Universität Zürich 1987

6 Anhang

6.1 Allgemeine Geräte und Materialien

6.1.1 DNA Isolierung

Lysis-Puffer pH 7,5

320 mM Saccharose

Roth, Karlsruhe, D

100 mM TRIS –HCl

Roth, Karlsruhe, D

1% (v/v) Triton X-100

Roth, Karlsruhe, D

5% SDS in E-Pure Wasser

SDS (Perlen)

Serva, Heidelberg, D

STE-Puffer pH 7,5

100 mM Natriumchlorid

Roth, Karlsruhe, D

50 mM TRIS-HCl

Roth, Karlsruhe, D

1 mM EDTA (Titrierkomplex III)

Roth, Karlsruhe, D

Proteinase K

Roche, Mannheim, D

50 mg/ml

Isoamylalkohol

Roth, Karlsruhe, D

Chloroform p.a.

Roth, Karlsruhe, D

Gebrauchslösung: 1 Teil Isoamylalkohol + 24 Teile Chloroform

Roti-Phenol

Roth, Karlsruhe, D

3 M Natriumacetat pH 5,5

Merck, Darmstadt, D

10 x TE-Puffer pH 8,0

100 mM TRIS-HCl

Roth, Karlsruhe, D

10 mM EDTA (Titrierkomplex III)

Roth, Karlsruhe, D

Gebrauchslösung: 1 x TE

6.1.2 Agarosegelelektrophorese

Agarose Biozym, Hessisch Oldendorf, D

Ethidiumbromid Sigma, St. Louis, MO, USA

Stammlösung: 0,2%

Färbebad: 30 µl Stammlösung auf 500 ml Wasser

10 X TBE Puffer

0,89 M TRIS-HCl

Roth, Karlsruhe, D

0,87 M Borsäure (H₃BO₃)

Merck, Darmstadt, D

20 mM EDTA (Titrierkomplex III)

Roth, Karlsruhe, D

Gebrauchslösung: 1x TBE

Gelkammern

Forschungswerkstätten, MHH, D

Probenpuffer

0,05% (w/v) Xylencyanol

Sigma, St. Louis, MO, USA

0,05% (w/v) Bromphenolblau

Serva, Heidelberg, D

40% Glycerin

Fluka, Buch, CH

6.1.3 Direct Blotting

Direct Blotter Apparatur GATC 1500

GATC, Konstanz, D

Elektrophoresesequenzierer

Hybond N⁺ Nylon-Membran

Amersham, Freiburg, D

4% Polyacrylamidgellösung

100g Harnstoff

Roth, Karlsruhe, D

30 ml bidestilliertes Wasser

20 ml 10 x TBE-Puffer (s. 9.3.2)

26 mL 30% Acrylamid/Bisacrylamid

Roth, Karlsruhe, D

37,5:1; Rotiphorese Gel 30

Ad 200 ml mit bidest. Wasser

APS

Roth, Karlsruhe, D

Gebrauchslösung: 20% in bidest. Wasser

TEMED

Serva, Heidelberg, D

Silanlösung

300 µl bidest. Wasser

55 µL Silan

Merck, Darmstadt, D

30 µL konz. Essigsäure

Merck, Darmstadt, D

9,7 ml 98% Ethanol

Roth, Karlsruhe, D

Natriumhydroxid

Roth, Karlsruhe, D

Gebrauchslösung: Ca. 0,8 M Natronlauge zum Desilanisieren von Elektrophoreseglasplatten

Probenpuffer

0,2% (w/v) Xylencyanol

Sigma, St. Louis, MO, USA

0,2% (w/v) Bromphenolblau

Serva, Heidelberg, D

Formamid

Fluka, Buchs, CH

6.1.4 Chemilumineszenzdetektion**10 x Puffer I pH 7,5**

1 M TRIS-HCl

Roth, Karlsruhe, D

1,5 M Natriumchlorid

Roth, Karlsruhe, D

Gebrauchslösung: 1 x

2 x P3 Puffer pH > 9

200 mM TRIS-HCl

Roth, Karlsruhe, D

200 mM Natriumchlorid

Roth, Karlsruhe, D

150 mM Magnesiumchlorid x 6 Wasser;

Merck, Darmstadt, D

p.a.

Gebrauchslösung: 1 x

Blockingreagenz

Roche, Mannheim, D

Gebrauchslösung: 6,75g Blocking-Reagenzpulver wurden bei 200°C unter Rühren in 450 ml 1x P1 Puffer gelöst.

Anti-Biotin-alkalische-Phosphatase-Fab-Fragmente (0,75 U/ µl)

Roche, Mannheim, D

5 – 8 µl in 225 ml Blockingreagenzlösung

CDP Star

Tropix, Bedford, MA, USA

Sapphire II

Tropix, Bedford, MA, USA

Gebrauchslösungen:Konzentrierte CDP-Star Lösung:

45 ml 1x P3-Puffer

5 ml Sapphire II

0,5 ml CDP-Star

Verdünnte CDP-Star-Lösung:

40 ml 1x P3-Puffer

5 ml Sapphire II

5 ml konz. CDP-Star-Lsg.

Amersham Hyperfilm™ MP

Amersham, Freiburg, D

Entwicklerlösung für Röntgenfilme

TETENAL, Norderstedt, D

Gebrauchslösung: 1:5 Verdünnung mit entmineralisiertem Wasser

Fixiersalz

TETENAL, Norderstedt, D

Gebrauchslösung: 100 g auf 2,5 l entmineralisiertes Wasser

Schlauchfolie

OMNILAB, Bremen, D

Filterpapaier

OMNILAB, Bremen, D

6.1.5 PCR-Reagenzien

dNTPs

Roth, Karlsruhe, D

Stammlösungen:

100 mg dNTP (A, G, C, T)

100 µl 1M TRIS-HCl pH 7,0

900 µl bidest. H₂O

pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls mit 1M TRIS-HCl einstellen

Ad 1,1 ml mit bidest H₂O

Alle vier Stammlösungen wurden zunächst auf 10 mM mit bidest. H₂O verdünnt.

Die Arbeitslösung enthält 8 mM dNTPs (2 mM jedes Nukleotids), d.h. alle vier Stammlösungen wurden in einem weiteren Schritt 1 : 5 verdünnt (z.B. je 200 µL dNTP + 200 µl bidest. H₂O).

Je PCR Ansatz wurden 0,8 mM dNTPs eingesetzt.

Oligonukleotide

InviTek, Berlin, D

Invitrogen, Karlsruhe, D

Stammlösung: 50 µM

Arbeitslösung: 5 µM

Pro PCR Ansatz wurden 0,5 µM Oligonukleotide eingesetzt.

Taq Polymerase (5 U/µl)

InviTek, Berlin, D

Je PCR Reaktion wurden 0,05 oder 0,08 µl Taq Polymerase eingesetzt.

PCR 10 x NH₄⁺ Reaktionspuffer

InviTek, Berlin, D

500 mM Tris-HCl pH 8,8

160 mM Ammoniumsulfat (NH₄)SO₄

0,1% Tween® 20

Je PCR Reaktion wurde der Puffer in einfacher Konzentration eingesetzt.

50 mM Magnesiumchlorid MgCl₂

InviTek, Berlin, D

Betain Monohydrat

Fluka, Buchs, CH

Stammlösung: 4M

Je PCR Ansatz betrug die Konzentration 0,8 – 1,2 M

DMSO

Merck, Darmstadt, D

Paraffinöl

Fluka, Buchs, CH

GenomiPhi-Kit

GE Healthcare

6.1.6 Kultivierung porciner BAC-Klone

LB-Medium

15g Trypton
5g Hefeextrakt
10g Natriumchlorid

Applichem, Darmstadt, D
Oxoid, Hampshire, UK
Roth, Karlsruhe, D

LB-Agar

Agar-Agar
2% Agar in LB-Medium

Roth, Karlsruhe, D

Einfriermedium

LB-Medium mit 10 – 15% Glycerin

Kryoröhrchen

Nunc GmbH & Co. KG; Langenselbold, D

Chloramphenicol

Fluka, Buchs, CH

12,5 µg/ml LB-Medium bzw. Agar zur Kultivierung porciner BACs

6.1.7 BAC-Klone

Tabelle 16: Sequenzierte BAC-Klone

Bezugsquelle	Klonname	Enthaltene(s) Gen(e)
ARK-Genomics, Roslin Institut, Roslin, UK	PigE-98B8	Transferrinrezeptor 1
	PigE-101N6	pBD1
	PigE-71F2	PR39
BACPAC Resource Center, Oakland, Kalifornien, USA	CH242-119H19	Transferrin
	CH242-433O23	TLR7 / TLR8
	CH242-478N14	TLR9
	CH242-46P3	Transferrinrezeptor 2
	CH242-279P12	SARM1
	CH242-237C2	BPI
	CH242-385M24	TNFRSF9
	CH242-419I17	TNFRSF10A / B / C / D
	CH242-271I4	TNFRSF11A
	CH242-106L15	TNFRSF4 / TNFRSF18
	CH242-307D17	TNFRSF12A
	CH242-314C21	IL12Rb2 / IL23R
	RP44-380D12	CD14
	RP44-358L10	CD95
	RP44-358P12	CD40
	RP44-337G9	TNFRSF1B / TNFRSF8
RP44-353N17	IFNGR1	
RP44-414I18	TNFRSF11B	
INRA, Paris, F	Pigl-249G7	TLR3
	Pigl-433D11	IL18R1

6.1.8 Allgemeine Geräte

Autoklaven	Tuttnauer, Breda, NL KSG, Olching, D
Gel Print 2000	Biophotonics, Ann Arbor, MI, USA
Leuchttisch	
Magnetheizrührer	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Mechanische Pipetten	GILSON, Middleton, WI, USA Eppendorf, Hamburg, D
Multiwell-Pipetten	Biohit, Köln, D
pH-Meter HI 83141	HANNA, Kehl am Rhein
Schüttler (horizontal)	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Spectrophotometer U3000	Hitachi, Tokio, J
Stromversorger	
Power-Pac 3000	BioRad, Hercules, CA, USA
EV 233	Consord
Thermoblock DB 1M	Techne, Staffordshire, UK
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Thermozykler	
Hybaid	OmniGene, Teddington, UK
Primus 96	Pequlab, Erlangen, D
Vortex REAX top	Heidolph, Kelheim, D
Waagen	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D
Wippe Hemodon IIIb	Travenol, Oberhaching, D
UV Transilluminator	Bachofer, Reutlingen, D
Zentrifugen	
Microfuge R	Beckmann, Fullerton, CA, USA
Hettich Universal	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D

6.1.9 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Essigsäure konz.	Merck, Darmstadt, D
Ethanol reinst	J. T. Baker, Deventer, NL
Küvette	Hellma, Müllheim, D
Latexhandschuhe Digitil PF	Hartmann, Heidenheim, D
Multiwell PCR Platten und Deckel	Greiner-Bio one, Frickenhausen, D
Nitrilhandschuhe	Kimberly-Clark, Dallas, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	Biohit, Köln, D Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße	Eppendorff, Hamburg, D Sarstedt, Nümbrecht, D
Salzsäure konz.	J. T. Baker, Deventer, NL

6.2 Verzeichnis der Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAC	Bacterial artificial chromosome
BES	BAC Endsequenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleotide
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Ssc.	Sus scrofa
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylen-diamin
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über den Projektablauf	11
Abbildung 2: Karte des pBeloBAC 11- Vektors	18
Abbildung 3: Übersicht über die Herkunft der Proben der Verbraucherstudie	32
Abbildung 4: PCR-Verlaufsschema	39
Abbildung 5: Darstellung der Direct-Blotting-Apparatur	42
Abbildung 6: Schematische Veranschaulichung der Zeitersparnis bei verschachtelter Auftragstechnik	45
Abbildung 7: Tetranukleotid-Marker visualisiert auf Röntgenfilm	47
Abbildung 8: Dinukleotid-Marker visualisiert auf Röntgenfilm	47
Abbildung 9: Auf Röntgenfilm visualisierte PCR-Produkte für 27 etablierte Marker, sortiert nach Güteklasseneinteilung	62
Abbildung 10: Vergleich der Allelzahlen in verschiedenen Kohorten	70
Abbildung 11: Vergleich der PIC-Werte in der Kontrollkohorte vs. Gesamt-PIC-Wert	70
Abbildung 12: Allelverteilungen des Markers für Tyk2	79
Abbildung 13: Allelverteilungen des Markers für CD95	80
Abbildung 14: Allelverteilungen des Markers für Transferrin	81
Abbildung 15: Allelverteilungen des Markers für Transferrinrezeptor 2	82
Abbildung 16: Allelverteilungen des Markers für TLR4	83
Abbildung 17: Allelverteilungen des Markers für IFNGR1	84
Abbildung 18: Allelverteilungen des Markers für IFNAR1 und IFNGR2	85
Abbildung 19: Allelverteilungen des Markers für CXCR2	86
Abbildung 20: Allelverteilungen des Markers für TNFRSF11B	87
Abbildung 21: Allelverteilungen des Markers für TNFRSF12A	88
Abbildung 22: Allelverteilungen des Markers für TNF α und β	89
Abbildung 23: Allelverteilungen des Markers für NRAMP1	90
Abbildung 24: Grafische Darstellung der Signifikanzniveaus an 12 Markerloci für 7 Vergleiche	99
Abbildung 25a: Allelverteilungen in kleinen Stichproben	103
Abbildung 25b: Allelverteilungen in kleinen Stichproben	104
Abbildung 26: Nicht parametrischer Vergleich des Schweregrades der Erkrankung zwischen den Rassen	108
Abbildung 27: Gruppe 1; Reihenfolge der Versuchstiere nach aufsteigender Krankheitsschwere bei Berücksichtigung des jeweils am mildesten erkrankten Ferkels pro Familie	112
Abbildung 28: Gruppe 2; Reihenfolge der Tiere nach aufsteigender Krankheitsschwere bei Berücksichtigung des jeweils am schwersten erkrankten Ferkels pro Familie	113

6.4 Oligonukleotidsequenzen und PCR Bedingungen

Tabelle 17: Übersicht über alle als Marker etablierten Mikrosatellitenmotive

Primernamen	Sequenz 5' → 3'	Motiv	Pg. [bp]	AT [°C]	MgCl ₂ [mM]	Ü	Betain / DMSO
PIG-TNFRSF1A-Biotin-F TNFRSF1A-R	ACCTATCCTTCGTCCTGGC CAGCCACTTACCTGGTGCTAC	(gt) ₁₁	164	65	3	R	-
Tyk2-2-F-Biotin Tyk2-2-R	GGAACCTCCTAACCCCTGAA CCGATTTGATTCAACCCCTA	(ttgt) ₇	204	60	3	R	-
Tyk2-4-F-Biotin Tyk2-4-R	TGGTCAGGGAAGTTCCACAT CCTGCCTAAGCCACATTTTG	(aaag) ₉	197	65	3	R	-
CD14-1-F-Biotin CD14-1-R	CACATCCAAGAAGCTCAACAA GCCTGGGAAGTTGCATAAAC	(tttg) ₅	175	60	3,3	R	Betain
CD14-10-F-Biotin CD14-10-R	TGAACAGGAAAAGGGTGAGG GGGTACCGCCCTAAAAAGAC	(tttc) ₈	152	60	3,3	R	-
CD95-5-F-Biotin CD95-5-R	TGGTTATAAGAGGCTGGACTTTTT TGGAACCAAGAAAGAAAAAGAAA	(aaag) ₂₂	199	60	3,3	R	-
CD95-7-F-Biotin CD95-7-R	TGAAACCGTGGTGAAAAGGT CTGTTGTGGCTCAGGTTTGA	(tttat) ₇	151	60	3,3	F	Betain
BPI-2-F-Biotin BPI-2-R	TGAAGAGAAGGCTGCTGTGA GGCTCTTTGTGTGAGTGTGC	(ca) ₂₈	197	65	3,3	F	-
BPI-3-F-Biotin BPI-3-R	TAAGGATCTGGCTTGGGTTG CCCTTGGCTCTTATTTGCAG	(ta) ₁₅	183	60	3,3	R	-
BPI-6-F-Biotin BPI-6-R	TCGGACCTAGTGTGCTGTG TCCGGGAACCATGTTAAAAA	(aca) ₁₁	181	55	6,6	R	Betain
TF-1-F-Biotin TF-1-R	ACAGTGACTGGAGCAGAGCA AAGCCAGGATAGTAATTGAGATTC	(gt) ₁₈	190	60	3,3	R	-
TFR1-9-F-Biotin TFR1-9-R	GAAGCCCAGAAGCTCTGAAA AGCTCAGATCCCATGTTGCT	(gt) ₇	160	65	6,6	R	-
TFR2-1-F-Biotin TFR2-1-R	GCTGGGAAGTTCCACACACT TTATCACTCACCTGATTTCCAA	(aaag) ₁₇	178	60	3,3	R	-
pBD1-4-F-Biotin pBD1-4-R	GCCTCAGGAGTGTGTTGTGTA TGTCAGTAGCCAGTGTGTTGG	(attt) ₈	168	65	3,3	F	-
PR39-1-F-Biotin PR39-1-R	AGCCTCACCCAAGCTGTGT CCATATCACTTGTTCCTCT	(ca) ₁₉	153	60	3,3	R	DMSO
TLR1/6/10-1-F-Biotin TLR1/6/10-1-R	CAGCAAGTGGTTCCAAATGA GACCCCTAGCCTGAGAACCT	(tta) ₆	150	65	3,3	R	-
TLR1/6/10-3-F-Biotin TLR1/6/10-3-R	AGGCGTTAGGACTTCAGCAT CATGACTTCACACATCCAGCA	(gt) ₁₅	194	65	3,3	F	-
TLR2-1-F-Biotin TLR2-1-R	CCCCAGGTCATATGTTCCAT ATGGCATGGTCCAGAGAGTT	(tg) ₁₃	183	60	3,3	R	-
TLR2-5-F-Biotin TLR2-5-R	CTCCAATTCGACCCCTAGC GCGGGGTGGTTATTCTTTCT	(aat) ₁₁	161	65	10	F	Betain
TLR3-1-F-Biotin TLR3-1-R	AAACATATAAAGCAGCCAGCA AAAGTCCTGATACACACATGGA	(ac) ₁₉	196	60	3,3	R	-
TLR4-1-F-Biotin TLR4-1-R	AGCAGCCCAAAGAAATAGCA AGGAACTAAGCCCCAAGGA	(ataa) ₁₂	159	65	3,3	F	-

Primername	Sequenz 5' → 3'	Motiv	Pg. [bp]	AT [°C]	MgCl ₂ [mM]	Ü	Betain / DMSO
TLR7/8-2-F-Biotin TLR7/8-2-R	TTTGCCACATCTGCTTTATCA GGCAGGGTCCTTGTCTTAG	(atct) ₁₁	173	60	3,3	R	-
TLR9-1-F-Biotin TLR9-1-R	CGATGGGAGCCTCTCTGA CTGTTGCCTGCTAGGTGGAG	(ac) ₄₂	176	60	3,3	R	DMSO
TNFRSF1B-1-F-Biotin TNFRSF1B-1-R	GAGATTCCTGGCTGTTCCACC ACTGGCTGACATGGGTTCTC	(gt) ₁₉	171	60	3,3	R	-
IFNGR1-3-F-Biotin IFNGR1-3-R	CACACTGCTCCAAATTCCAG CCTCCCCTATTTTCCCCTTA	(aaga) ₁₃	180	60	3,3	R	-
IFNGR2/IFNAR 1-2-F-Biotin IFNGR2/IFNAR 1-2-R	CCTGGGAATCTCCATATGCT AAGCAATGGGCTGTTTCTTG	(atag) ₁₃ ⁺ (agac) ₇	172	60	1,5	R	-
IFNGR2/IFNAR 1-4-F-Biotin IFNGR2/IFNAR 1-4-R	TCCATATGCCATGAGTGTGG ACACATGGCACACATGTCCT	(aaag) ₁₆	208	60	2	R	-
CXCR2-BES-F-Biotin CXCR2-BES-R	AGACCCCTTTCCAGCTCT GCTTCTAGGGGTGATGTGCT	(ca) ₂₃	160	60	1,6	R	DMSO
IL23R-1-F-Biotin IL23R-1-R	CAACCCAGCCAAAGGTAAAG CCTCGGCAAACCTAACACTC	(aac) ₆	195	65	6,6	F	Betain
IL23R-3b-F-Biotin IL23R-3b-R	CTGCCATCAAGTGGTAGAAGG TTGAGGGGATACAGAGAGGAAA	(ac) ₁₃	200	65	6,6	R	Betain
IL18R1-6-F-Biotin IL18R1-6-R	CAGGGTGGGATATGCTGAGA CCAACCCGTAAGTGAAAATCA	(tg) ₁₄	152	60	3,3	F	-
CD40-3-F-Biotin CD40-3-R	GGGAGACAAAAAGGCACAAA CCACGGAGTTAAGAAGTGGAG	(ac) ₁₉	167	60	3,3	R	Betain
TNFRSF11B-3-F-Biotin TNFRSF11B-3-R	TGAAGCCATCAGCTAGTCTCAA GGTCTGACCTTTTCAAACACA	(ac) ₂₁	171	60	3,3	R	-
TNFRSF12A-6n-F-Biotin TNFRSF12A-6n-R	CACATGGCACTCAAAGTGGT CTTGAGTAGTGGGAGGCAAA	(ca) ₁₉	168	60	3,3	F	-
PIG TNF-A PIG TNF-B-Biotin	CTGGTCAGCCACCAAGATTT GGGGAAATGAGAAGTGTGGA	(ctg) ₂₀	196	60	3,3	B	-
PIG NRAMP1-A PIG NRAMP1-B-Biotin	AAGCAGTGCTCTCAACCTTTTC CGATCCAGTCACCTCTAGGC	(ca) ₂₀	158	60	3,3	A	-

Pg.: Produktgröße auf Basis der Referenzsequenz

AT: Verwendete Annealingtemperatur

Ü: Gibt an, welcher Primer im 5-fach Überschuss eingesetzt wurde

F bzw. A: Forward Primer

R bzw. B: Reverse Primer

Tabelle 18: Übersicht über alle nicht als Marker etablierbaren Mikrosatellitenmotive

Primernamen	Sequenz 5' → 3'	Motiv	Pg. [bp]	Ausschlusskriterium
Tyk2-Biotin-F Tyk2-R	CAGTCCAGCATCTCAGCAG GGTGTCCAGACCCTTTGTT	(ca) ₁₅	160	Nicht auswertbar
Tyk2-1-F-Biotin Tyk2-1-R	CTCGGATCCCAAGTCACTGT GTGCCAGCATACCATTACCC	(taaa) ₉	200	Gleiches Muster wie Tyk2-2
Tyk2-3-F-Biotin Tyk2-3-R	ATTGAACCCGCAACCTCAT GATCCTGTGTTGCTGTGGTG	(tat) ₁₀	198	Nicht auswertbar
CD14-2-F-Biotin CD14-2-R	GGGGAAAAGGGGAATTTTGAA AGGAAAAGGGTGGAGGAAAC	(aagg) ₁₇	200	Nicht auswertbar
CD14-3-F-Biotin CD14-3-R	TGGGGATTATGTGCCCTCTA CCACTTTCGGCTTCTCAAAG	(tcgggc) ₅	191	Nicht informativ
CD14-4-F-Biotin CD14-4-R	CGGTAGCTCAGGTTTGATCC CAGCTCAGATTCGACCCCTA	(aaac) ₆	196	Nicht auswertbar
CD14-11-F-Biotin CD14-11-R	CAAAGAAGGGGAAGGGAGGA AAGGATCCAGCGTTGCTACT	(tttg) ₆	173	Nicht informativ
CD14-12-F-Biotin CD14-12-R	TGCTATGGCTGTGGTGTAGG CTTCCCTCACTCCCTCCTTC	(ga) ₈	152	Nicht auswertbar
CD95-1-F-Biotin CD95-1-R	GCTGAGCCATGACAGGAACT CCTGAGATGGGATTTAGAAGGA	(cttt) ₃₅	198	Nicht auswertbar
CD95-2-F-Biotin CD95-2-R	CAAGGCGATGATTCAAGTT CTCAAACCCAGACCACAAGG	(ttcc) ₁₀	172	Nicht informativ
CD95-3-F-Biotin CD95-3-R	TTCAGCCATGTGCCTCCTAT TCACGTGGAAGCAAAGAATG	(tg) ₃₃	189	Schlecht lesbar
CD95-4-F-Biotin CD95-4-R	ACCATTGTGAAAAGGGTCCA TTGCTGTGGCTCTGGTGTAG	(ttatt) ₆	165	Schlecht lesbar
CD95-6-F-Biotin CD95-6-R	ACCCTAGCAGCACATTCTGG GGATTTGCCAAAGAAATAGCA	(ca) ₁₃	164	Nicht informativ
BPI-1-F-Biotin BPI-1-R	GGTCCATGTTGTTGCAAGTG ATTTACACCCCCTACCGACA	(gt) ₁₉	167	Schlecht lesbar
BPI-4-F-Biotin BPI-4-R	CATGTGTGCGTTTTTCGTTTC TTGTACCCCCACAACCTTTG	(gt) ₁₅	195	Schlecht lesbar
BPI-5-F-Biotin BPI-5-R	TGGGTCTGACACAGATGAGAA CAAACCTATGGCTTGGATCTGA	(tttg) ₂₂	189	Nicht informativ
BPI-7-F-Biotin BPI-7-R	TCCCTGAGTGGGAATAGGAA GGGAGGCAGGAGGAGTACAT	(ac) ₁₆	176	Schlecht lesbar
BPI-8-F-Biotin BPI-8-R	TTTGACCATGAGAGCGTTTG TTTGCCCTAAAAGCAAAAA	(ttcc) ₁₀	197	Nicht informativ
TF-2-F-Biotin TF-2-R	GGGTCACGGCTCTAACAGAT ACCAACCAGCCAAGAGTGAC	(tg) ₁₃	181	Nicht informativ
TFR1-2-F-Biotin TFR1-2-R	GGGCTTTCTATCCTGTTCCA CCTAGCTTGGGAACCTCCAT	(tta) ₆	163	Nicht auswertbar
TFR1-3-F-Biotin TFR1-3-R	GGCTACAGCTCCGATTCAAC AACCACGTCCTCATGGATA	(caa) ₁₁	177	Nicht auswertbar
TFR1-4-F-Biotin TFR1-4-R	AGCCAAGACATGGAAGCAAC CAAATGGCATTATTTCAATCCT	(ac) ₂₀	150	Nicht auswertbar
TFR1-6-F-Biotin TFR1-6-R	ACCTGCACCTCCACAGCTAC CTAGCCTGGGAACCTCCATA	(tta) ₇	176	Nicht auswertbar
TFR1-12-F-Biotin TFR1-12-R	GTTTGGGACGGAAATGCTAT TTCCTCAAATGCCTAGGACTC	(taaa) ₄	178	Nicht informativ

Primernamen	Sequenz 5' → 3'	Motiv	Pg. [bp]	Ausschlusskriterium
TFR2-2a-F-Biotin TFR2-2a-R	AGCTCCGATTTGACCCCTA GTCCTTCATGATCCCTGAGC	(aca) ₇	163	Schlecht lesbar
TFR2-2b-F-Biotin TFR2-2b-R	CTTGGGTCAGGGCTATGGT AAAAGAATGTAAGGCACCTCCA	(at) ₁₂	174	Schlecht lesbar
TFR2-3-F-Biotin TFR2-3-R	CCTGAGAAGCGAAGAAGCAT CCAGGTCTGTGGGCTATTTT	(ac) ₂₅	160	Nicht auswertbar
pBD1-1-F-Biotin pBD1-1-R	TGGATTGCTTTTCACTGCAT GGCTACAGCTCCGATTCAAC	(ttg) ₁₂	160	Nicht informativ
pBD1-3a-F-Biotin pBD1-3a-R	TGAAGTCTGGGAGCCTGATT GGCTACAGCTCCGATTCAAC	(ttg) ₉	164	Nicht auswertbar
pBD1-3b-F-Biotin pBD1-3b-R	AGCATGGTAAGGCATGATGA TTTTGCTAAGAGAGTAGATTTGAG G	(tg) ₂₀	175	Schlecht lesbar
pBD1-5a-F-Biotin pBD1-5a-R	GTGGCATGGGTTTGATCC TTTCTTCCCTCCGTCCTTCC	(ga) ₆ ⁺ (gag) ₇	175	Schlecht lesbar
pBD1-5b-F-Biotin pBD1-5b-R	CATTTTCTGGGTGAAGGAATG TTTGCAAGGCTTGTTCACA	(gt) ₁₅ ⁺ (ga) ₁₀	155	Schlecht lesbar
PR39-2-F-Biotin PR39-2-R	CCTCACCCATCTCTGTGGTT CAACTTCCTCCAGGCTTCAG	(ca) ₂₃	153	Schlecht lesbar
PR39-2b-F-Biotin PR39-2b-R	CCACAACCAGAACTCCAAGC CGAGTCTCTGGGGTTGTCAT	(aag) ₅	170	Nicht informativ
PR39-4-F-Biotin PR39-4-R	CCTTTTCAAACCTCCCTGCTG TGTCTTCCCACTTCCTGACC	(ca) ₂₃	174	Schlecht lesbar
PR39-6-F-Biotin PR39-6-R	CCAGTGGCAACTCCAAGAAT TCGTGGTTCTAGTCGGATT	(aata) ₆	164	Nicht informativ
PR39-7-F-Biotin PR39-7-R	AAGGGTCCCTAAACCTTAGTGC ACAGGGATGGGAGCAAGATT	(tatg) ₇	169	Nicht informativ
PR39-8-F-Biotin PR39-8-R	TCCCAGGCTAGGGGTCTAGT GATCCCTGGCCTCACTCAG	(cagcca) ₆	167	Nicht informativ
TLR1/6/10-2-F-Biotin TLR1/6/10-2-R	GAGCTGAGCTGCTGATTGTG CCCTGCTCATCATTTTTGGT	(aac) ₆	203	Nicht informativ
TLR1/6/10-4-F-Biotin TLR1/6/10-4-R	ATGGGAGGATGTGAGAGCAG TCCTTTCCAGTGTTTTGTG	(ca) ₁₆	142	Schlecht lesbar
TLR2-1b-F-Biotin TLR2-1b-R	TGGGACCTGCTGTGAAATG AGCCACCAGTGAAGTCAACT	(ca) ₄₂	157	Nicht auswertbar
TLR2-2-F-Biotin TLR2-2-R	ATGACTGTGGGTAGGCTGGA AGGGCCACATTTTCATAGCAA	(caaa) ₉	164	Nicht auswertbar
TLR2-3-F-Biotin TLR2-3-R	ATCTTGAGTCTTGGCTGGAGTT AGAAAGCATCACTCCCCAAA	(ttct) ₁₁	150	Schlecht lesbar
TLR2-4-F-Biotin TLR2-4-R	TGGTATTTGCTCCCTCAAGAA GGCAGCTGTGGCTGTGAT	(tctt) ₁₉ + (cctt) ₄	171	Nicht auswertbar
TLR3-3-F-Biotin TLR3-3-R	GTTGAACCTGTCCGAGCTGT CCTCCATATGCTGTGGGAGT	(ttg) ₉	170	Nicht informativ

Primername	Sequenz 5' → 3'	Motiv	Pg. [bp]	Ausschlusskriterium
TLR4-10-F-Biotin TLR4-10-R	GAAAAACCCACAGCTGTTTCCA GGGGATGTGATGGGTAATGT	(gt) ₂₁	176	Schlecht lesbar
TLR7/8-BES-F-Biotin TLR7/8-BES-R	TAGCTCAATCGGCAATCAAG GACGTCCTGGTCTCCAAAAA	(ca) ₂₀	166	Nicht informativ
TLR7/8-1-F-Biotin TLR7/8-1-R	ACCAGGGAActCCAACAAAT GACACTCTCTGGTTCCTGGTG	(aaag) ₁₇	177	Schwer lesbar
TLR9-2-F-Biotin TLR9-2-R	CCATGAGTGAGGCCCTAAAA CGCAGATGTGGCTTCAGAT	(tttct) ₁₀	190	Nicht informativ
TLR9-4-F-Biotin TLR9-4-R	GGTGTGGCCCTAAAAAGACA CGGCAGCTACAGCTCTGATT	(aaaag) ₅	165	Nicht informativ
SARM1-1-F-Biotin SARM1-1-R	ACAGGCCCATATGAGAGCAC AAGAGGGGAATAGGGCTCAA	(gt) ₂₁	158	Schwer lesbar
SARM1-2-F-Biotin SARM1-2-R	CCAGCTGGATTAAGATCTAACA TTGACCTGTAGCCTGGGAAC	(at) ₂₁	153	Nicht informativ
SARM1-3-F-Biotin SARM1-3-R	TGAACACCGTGCAAAGAATC TAGGCCAGTGGCTACAGCTC	(tta) ₆	161	Schwer lesbar
SARM1-4-F-Biotin SARM1-4-R	ATGGGAACCTGATCAGTGGGA AGGCCAGGAATGGTGTCT	(ag) ₁₅	159	Schwer lesbar
SARM1-5-F-Biotin SARM1-5-R	GGTGGCTACAGCTCCGACTA AGAGAAGGCTGGTGGACTCA	(aaca) ₆	200	Nicht informativ
SARM1-6-F-Biotin SARM1-6-R	ATCCAGTGCATGGTCAAGT TTATCCAGGAAAGGGGGACT	(tata) ₇	167	Nicht informativ
TNFRSF1B/8-2-F-Biotin TNFRSF1B/8-2-R	GTCACTGGGCTTGGAGAGAA AACCTTGACACCAGCCTGAC	(tc) ₂₅	191	Schwer lesbar
TNFRSF1B/8-3-F-Biotin TNFRSF1B/8-3-R	GGACATTTCACTGCACCGTA TGGTCTGGGAACTGAAATCC	(tta) ₆	163	Nicht informativ
IFNGR1-4-F-Biotin IFNGR1-4-R	TCCTTGAGTGTGTATGTGTGTTTG TGGTATGAGAAAATTACCGGTGT	(tg) ₁₃	156	Schwer lesbar
IFNGR2/IFNAR 1-1-F-Biotin IFNGR2/IFNAR 1-1-R	GGGAACCTTCATATGCCTCA GGGTGGGGGAAAAATGTAAT	(tagaa) ₉	208	Schlecht lesbar
IFNGR2/IFNAR 1-3-F-Biotin IFNGR2/IFNAR 1-3-R	TCTTTTCAGGGATGGCTGTT AATTCTGGTGGGGAGACAGA	(ca) ₁₅	171	Nicht informativ
IL23R/IL12Rb2- 2-F-Biotin IL23R/IL12Rb2- 2-R	CAGTCAAATGTTACACAActTTCAA CACTACAAATGGTAGGCCAAAA	(tta) ₇	180	Nicht auswertbar

Primername	Sequenz 5' → 3'	Motiv	Pg. [bp]	Ausschlusskriterium
IL23R/IL12Rb2-3a-F-Biotin IL23R/IL12Rb2-3a-R	TTTGGATCCACTCATGTTGC CCAAGACATGGAAGCCATCTA	(tata) ₈ + (ca) ₇	184	Schwer lesbar
IL18R1-4-F-Biotin IL18R1-4-R	TGCTGTGGCTGTGGTATAGG CAAATGAAACGAAGGGTCT	(aaat) ₇	158	Nicht auswertbar
TNFRSF4/18-1-F-Biotin TNFRSF4/18-1-R	GGAAGCATGACCTTCTCAGC ACTCTGCCAGGAGCATAAA	(cccct) ₅	158	Nicht auswertbar
TNFRSF4/18-2-F-Biotin TNFRSF4/18-2-R	GCAGATGGGGCCCTAAAA CTAGCCTGGGAACCTCTGTG	(ttg) ₅	177	Nicht informativ
TNFRSF4/18-6a-F-Biotin TNFRSF4/18-6a-R	TTGCTGTGGCTTTGGTGTAG TCCAATGCAATCCCTATCAA	(caa) ₅ + (caaa) ₄	164	Nicht informativ
TNFRSF4/18-7-F-Biotin TNFRSF4/18-7-R	TCAGCAGGTTAAGGGTCTGG CCCCACCTGTCAGAGTCTTC	(taa) ₅	159	Nicht informativ
TNFRSF4/18-8-F-Biotin TNFRSF4/18-8-R	CTAGCCTGGGAACCTCCATA AAGGCATCATACGATTTTTCTTTT	(caa) ₇ + (taa) ₄	158	Nicht auswertbar
CD40-4-F-Biotin CD40-4-R	GGAACAGGAGCAGGTGTGTT ACACTGCTAGGTGGCAAACC	(gt) ₂₂	159	Schwer lesbar
TNFRSF9-BES-F-Biotin TNFRSF9-BES-R	CCGTGTGTTCTCATTTCCTTC CCCTCGAATCTCCACAAGAC	(ggt) ₁₀	168	Nicht informativ
TNFRSF9-1-F-Biotin TNFRSF9-1-R	CCCCGACATGAATAGAAGA GGCCCAAGAAATAGCAACAA	(tta) ₇	152	Nicht auswertbar
TNFRSF9-2-F-Biotin TNFRSF9-2-R	AAGGGTTTACTGTAGAGCACAGG TTTAAGGTACAGCAAAGTGATTC AG	(ta) ₁₄	178	Nicht auswertbar
TNFRSF9-3-F-Biotin TNFRSF9-3-R	CGACACATCAGAGGTTTCCA GGATGGGCAAAGGTTATTTTT	(gt) ₂₀	180	Schwer lesbar
TNFRSF9-4-F-Biotin TNFRSF9-4-R	CTGCACGTAGGTAAGCCACA CGCAACCTCATGGTTCCTA	(ac) ₁₄	159	Schwer lesbar
TNFRSF10A-1-F-Biotin TNFRSF10A-1-R	CCTCCTCCCTTCTCATCCTT CCAGGAGGTGTGTCCATCTT	(tc) ₁₈ + (ca) ₁₅	179	Schwer lesbar
TNFRSF10A-4a-F-Biotin TNFRSF10A-4a-R	CATTAACCCACTGAGCAAGG CCCAAGACCAAGAAATAGCAA	(tta) ₁₃	180	Nicht auswertbar

Primername	Sequenz 5' → 3'	Motiv	Pg. [bp]	Ausschlusskriterium
TNFRSF10A-4b-F-Biotin TNFRSF10A-4b-R	TTTTTGGTTGGATGGTCTCC GACCATCAGGCTGAAACACA	(gttt) ₆	164	Nicht informativ
TNFRSF10A-6-F-Biotin TNFRSF10A-6-R	TGCAGCAGAAAATATCACAGC GGTGTGGATTTGATCCTTGG	(aaag) ₂₉	199	Nicht auswertbar
TNFRSF10A-9-F-Biotin TNFRSF10A-9-R	CTAGCCTGGGAACCTCCATA TCATGCCAATACCACCGTCT	(ca) ₁₆	150	Schwer lesbar
TNFRSF10A-10-F-Biotin TNFRSF10A-10-R	TCCTCCCTTCTCATCCTCCT ATTTTCAGACGCACACATGC	(tc) ₂₀ + (ca) ₁₇	165	Nicht auswertbar
TNFRSF10A-13-F-Biotin TNFRSF10A-13-R	TCCTCACCTTTCAGACCTATTTTC TGCAGGCAAACAGTTCATTT	(caaa) ₆	177	Schwer lesbar
TNFRSF11A-2-F-Biotin TNFRSF11A-2-R	TTCACTTCTCTTGCCCTTCG TCCTTGGATGTGAAGAACGA	(ac) ₂₄	153	Nicht auswertbar
TNFRSF11A-3-F-Biotin TNFRSF11A-3-R	GCCCCTCATCATGTGGAAT TCTAGAGAGGTTTTACCAAGTTAG CA	(tg) ₂₂	169	Schwer lesbar
TNFRSF11A-4a-F-Biotin TNFRSF11A-4a-R	AAGTTCATCCATGTTTCTGCAC CCATCAACAGATGAATGGATAAGA	(ac) ₁₄	172	Nicht informativ
TNFRSF11A-4b-F-Biotin TNFRSF11A-4b-R	TTGTGTCAATTTCTGCTGTATGG AAATGTAAGCAATATGCTTCTAACA GA	(ta) ₁₃	154	Nicht informativ
TNFRSF11A-5-F-Biotin TNFRSF11A-5-R	CCTTGACCTTCATTTGTTTGC TGGGAACCTTTCACATGTTGC	(at) ₁₃	172	Nicht informativ
TNFRSF11B-6-F-Biotin TNFRSF11B-6-R	TTTTGCATTTTAAACAGCATGG GGAGAGGCGCAGACTACATT	(tgttt) ₅	187	Nicht informativ
TNFRSF12A-1a-F-Biotin TNFRSF12A-1a-R	TCCTTGGATGTGAAGAACGA TTCACTTCTCTTGCCCTTCG	(ac) ₂₄	153	Schwer lesbar

Pg.: Produktgröße auf Basis der Referenzsequenz

F: Forward Primer

R: Reverse Primer

6.5 Probenherkunft

Tabelle 19: Detaillierte Informationen zu den Proben der Verbraucherstudie

Nr.	Stadt	Kaufdatum	Kaufort	Fleischart	Zustand
1	Hannover	16.02.06	Rewe Linden	Leber	Abgepackt, W. Brandenburg
2	Hannover	16.02.06	Kaufhof am Hauptbahnhof	Niere	abgepackt
3	Kiel	21.03.06	Edeka	Bauchfleisch	Frischetheke
4	Kiel	21.03.06	Edeka	Carbonade	abgepackt
5	Neumünster	21.03.06	Penny	Minutensteak	abgepackt
6	Neumünster	21.03.06	Penny	Kotelett	abgepackt
7	Neumünster	21.03.06	Schlachter Brinkhoff	Leber	frisch
8	Neumünster	21.03.06	Schlachter Brinkhoff	Niere	frisch
9	Pinneberg	21.03.06	Feinkost Meier im Spar-Markt	Leber	Frischetheke
10	Hamburg Hbf	21.03.06	Rewe	Leber	Abgepackt, W. Brandenburg
11	Hamburg Hbf	21.03.06	Rewe	Bauchfleisch	Abgepackt, W. Brandenburg
12	Hamburg Harburg	21.03.06	Marktkauf	Leber	Abgepackt, "Landfleisch"
13	Hamburg Harburg	21.03.06	Marktkauf	Niere	Abgepackt, "Landfleisch"
14	Berlin Zoo	23.03.06	Wertheim	Bauchfleisch	Abgepackt, W. Brandenburg
15	Berlin Ostbahnhof	23.03.06	MiniMal	Leber	Abgepackt, W. Brandenburg
16	Berlin Ostbahnhof	23.03.06	Lidl	Bauchfleisch	Abgepackt, "Oldenländer"
17	Berlin Ostbahnhof	23.03.06	Fleischerei Naesert	Leber	frisch
18	Dresden Hbf	23.03.06	Fleischerei Täubrich	Kotelett	Frisch
19	Dresden Hbf	23.03.06	Netto	Leber	Frischetheke
Nr.	Stadt	Datum	Kaufort	Fleischart	Zustand
20	Dresden Hbf	23.03.06	Fleischerei Täubrich II	Leber	Frisch
21	Dresden Hbf	23.03.06	Aldi	Schweine-Nackensteak	Abgepackt, "Bauernglück"
22	Leipzig	23.03.06	Schlachter Sogut	Leber	frisch
23	Leipzig	23.03.06	Schlachter Sogut	Zunge, gepökelt	frisch
24	Leipzig	23.03.06	Schlachter im Bahnhof	Leber	Frisch
25	Leipzig	23.03.06	MiniMal	Bauchfleisch	Abgepackt, W. Brandenburg
26	Halle	23.03.06	Rewe Nahkauf	Leber	Abgepackt, W. Brandenburg
27	Jena	24.03.06	?	Leber	frisch
28	Jena	24.03.06	?	Niere	frisch
Nr.	Stadt	Datum	Kaufort	Fleischart	Zustand
29	Jena	24.03.06	?	Minutensteaks	Abgepackt, "Gut & Günstig"
30	Jena	24.03.06	?	Leber	frisch

Nr.	Stadt	Kaufdatum	Kaufort	Fleischart	Zustand
31	Stuttgart	28.03.06	Edeka (im Karstadt)	Kotelett	Frischetheke
32	Stuttgart	28.03.06	Edeka (im Kaufhof)	Leber	Frischetheke
33	Stuttgart	28.03.06	Edeka (im Kaufhof)	Niere	Frischetheke
34	Heidelberg	28.03.06	Kaufland	Leber	abgepackt (aus Neckarsulm)
35	Heidelberg	28.03.06	Kaufland	Niere	abgepackt (aus Neckarsulm)
36	Darmstadt	28.03.06	Schlachter Lach	Leber	frisch
37	Koblenz	30.03.06	Fleischer Rastinger (im Edeka)	Leber	Frischetheke
38	Koblenz	30.03.06	Fleischer Rastinger (im Edeka)	Niere	Frischetheke
39	Koblenz	30.03.06	Lidl	Minutensteak	abgepackt, "Oldenländer"
40	Bonn	30.03.06	Kaufhof	Leber	abgepackt
41	Bonn	30.03.06	Kaufhof	Niere	abgepackt
42	Bonn	30.03.06	Schlachter Casserole	Bauchfleisch	frisch
43	Düsseldorf	30.03.06	Plus	Minutensteak	abgepackt
44	Düsseldorf	30.03.06	Fleischer Schlosser	Leber	frisch
45	Dortmund	30.03.06	Aldi (im Kaufhof)	Minutensteak	abgepackt
46	Magdeburg	31.03.06	Schlachter Altmärker	Leber	frisch
47	Magdeburg	31.03.06	Kaufland	Leber	abgepackt, "Purland"
48	Gelsenkirchen	04.04.06	Kaufpark	Leber	abgepackt
49	Gelsenkirchen	04.04.06	Kaufpark	Bauchfleisch	abgepackt
50	Gelsenkirchen	04.04.06	Kaufpark	Leber	Frischetheke
51	Gelsenkirchen	04.04.06	Schlachter Ridderskamp & Hahn	Leber	frisch
Nr.	Stadt	Datum	Kaufort	Fleischart	Zustand
52	Recklinghausen	04.04.06	Aldi	Minutensteak	abgepackt, "Bauernglück"
53	Münster	04.04.06	Schlachter Casserole (im Kaufhof)	Kotelett	frisch
54	Rheine	04.04.06	Lidl	Bauchfleisch	Abgepackt, "Oldenländer"
55	Osnabrück	04.04.06	Schlachter im Allfrisch (im Kaufhof)	Leber	Frischetheke
56	Osnabrück	04.04.06	Schlachter im Allfrisch (im Kaufhof)	Bauchfleisch	Frischetheke
Nr.	Stadt	Datum	Kaufort	Fleischart	Zustand
57	Osnabrück	04.04.06	Schlachter im Allfrisch (im Kaufhof)	Minutensteak	abgepackt, "Gut & Günstig"
58	Wadenburg	15.04.06	Schlachter im Combi-Markt	Bauchfleisch	Frischetheke

Nr.	Stadt	Kaufdatum	Kaufort	Fleischart	Zustand
59	Rostock	15.04.06	Schlachter Kaschau	Bauchfleisch	frisch
60	Rostock	15.04.06	Sky	Leber	abgepackt
61	Rostock	15.04.06	Plus	Minutensteak	abgepackt
62	Essen	29.04.06	Edeka	Leber	abgepackt
63	Bremen	27.05.06	Schlachter Willers	Leber	frisch
64	Pilsting (Bayern)	09.06	Metzger Pollinger	Leber	frisch
65	Bayern	09.06	Großmetzgerei Donauland	Leber	frisch
66	Würzburg	20.09.06	lokale Kette	Leber	abgepackt
67	Saarbrücken	01.07	?	Leber	frisch
68	Fulda	08.11.06	?	Leber	frisch
69	Fulda	08.11.06	?	Leber	frisch

Herkunftsorte des abgepackten Fleisches:

1. W. Brandenburg: Wilhelm Brandenburg GmbH & Co. OHG, 60386 Frankfurt
2. Oldenländer: Fleischwaren GmbH & Co. KG, 33378 Rheda
3. Bauernglück: SB-Fleisch & Convenience GmbH, 33378 Rheda-Wiedenbrück
4. Gut & Günstig (Jena): Schiller Fleisch GmbH, 95030 Hof / Saale
5. Kaufland: Kaufland Fleischwaren SB GmbH & Co. KG, Rötelstr. 35, 74172 Neckarsulm

Tabelle 20: Detaillierte Informationen zu den Wildschweinproben

1	DNA aus Tonsillen von Frischlingen	Zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. T. Leeb; genaue Herkunft und Verwandtschaftsgrad unbekannt	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12	DNA aus Tonsillen von Bachen	Zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. L. Wiehlmann; unverwandte Tiere	
13			
14			
15			
16			
17	Bache; geschossen am 14.11.05 in Nienburg		
18	Eber; geschossen am 16.11.05 in Nienburg		
19	Geschlecht unbekannt; geschossen am 15.12.05 in Nienburg		
20	Geschlecht unbekannt; geschossen am 19.12.05 in Nienburg		

Tabelle 21: Detaillierte Informationen zu den Mangalitzaprogen

1	Geschwister-Ferkel	Privat organisierte Proben; zur Verfügung gestellt von Herrn G. Naschitzki aus Rödinghausen
2		
3		
4		
5		
6		
7	Geschwister-Sauen	Privat organisierte Proben; zur Verfügung gestellt von Familie Häsker aus Worpswede
8		
9		
10	Eber	Privat organisierte Proben; zur Verfügung gestellt von Familie Veen aus Osterode
11	Sau	
12	Geschwister-Ferkel	Privat organisierte Proben; zur Verfügung gestellt vom Hof Johannis Hag in Osterode
13		
14		
15		
16		

6.6 Allelfrequenzen

6.6.1 Rohdaten zur PIC-Wertberechnung für alle Marker

Der folgenden Tabelle sind die Rohdaten zur PIC-Wertberechnung auf Basis der Allelfrequenzen in der Kontrollkohorte für alle 36 etablierten Marker zu entnehmen.

Tabelle 22: Rohdaten zur PIC-Wertberechnung für alle 36 Marker

Gen / Markername						Summe
TNFRSF1A MS 1	Beobachtete Allele	10	12	13	18	4
	Anzahl	44	11	48	1	104
	Frequenz [%]	42,3	10,6	46,2	0,96	100
	PIC-Wert	0,51				-

Tyk2 MS 2	Beobachtete Allele	10	11	12	3
	Anzahl	52	1	51	104
	Frequenz [%]	50	0,96	49	100
	PIC-Wert	0,39			-

Tyk2 MS 4	Beobachtete Allele	10	11	12	17	4
	Anzahl	28	66	3	1	98
	Frequenz [%]	28,6	67,3	12,2	5,9	100
	PIC-Wert	0,35				-

CD14 MS 1	Beobachtete Allele	10	17	18	3
	Anzahl	10	7	81	98
	Frequenz [%]	10,2	7,14	82,65	100
	PIC-Wert	0,28			-

CD14 MS 10	Beobachtete Allele*	10	11	12	13	14	15	15,5	16	17	17,5	10
	Anzahl	10	1	3	2	13	24	2	24	11	4	
	Frequenz [%]	10,6	1,1	3,2	2,1	13,8	25,5	2,1	25,5	11,7	4,3	100
	PIC-Wert	0,80										-

*teilweise unterbrochene Motive aufgrund von Leserasterverschiebungen

CD95 MS 5	Beobachtete Allele*	10	11	18,5	19	19,5	20	20,5	21	22	22,5	23	23,5	26	12
	Anzahl	13	26	6	6	2	3	3	6	6	5	7	1	4	88
	Frequenz [%]	14,8	29,5	6,8	6,8	2,3	3,4	3,4	6,8	6,8	5,7	8	1,1	4,5	100
	PIC-Wert	0,85													-

*teilweise unterbrochene Motive aufgrund von Leserasterverschiebungen

Gen / Markername												Summe
CD95 MS 7	Beobachtete Allele	11	13	14	16	22	23					6
	Anzahl	9	2	2	54	2	35					104
	Frequenz [%]	8,7	1,9	1,9	51,9	1,9	33,7					100
	PIC-Wert	0,54										-
BPI MS 2	Beobachtete Allele	10	11		17		19					4
	Anzahl	50	16		2		2					70
	Frequenz [%]	71,4	22,9		2,9		2,9					100
	PIC-Wert	0,38										-
BPI MS 3	Beobachtete Allele	10	30	31	33	40	41	52	53	54	56	10
	Anzahl	3	5	70	5	5	2	4	1	4	1	100
	Frequenz [%]	3	5	70	5	5	2	4	1	4	1	100
	PIC-Wert	0,49										-
BPI MS 6	Beobachtete Allele	10		11			11-1				3	
	Anzahl	10		86			8				104	
	Frequenz [%]	9,6		82,7			7,7				100	
	PIC-Wert	0,28										-
TF MS 1	Beobachtete Allele	10	11	13	14	15	16	17	7			
	Anzahl	28	19	14	5	16	18	2	102			
	Frequenz [%]	27,5	18,6	13,7	4,9	15,7	17,6	1,9	100			
	PIC-Wert	0,79										-
TFR1 MS 9	Beobachtete Allele	10				11					2	
	Anzahl	34				52					86	
	Frequenz [%]	39,5				60,5					100	
	PIC-Wert	0,36										-
TFR2 MS 1	Beobachtete Allele	10	16	17	18	19	20	21	22	26	9	
	Anzahl	12	14	17	4	7	1	16	27	4	102	
	Frequenz [%]	11,8	13,7	16,7	3,9	6,9	1	15,7	26,5	3,9	100	
	PIC-Wert	0,82										-
pBD-1 MS 4	Beobachtete Allele	10		11			12				3	
	Anzahl	86		7			9				102	
	Frequenz [%]	84,3		6,9			8,8				100	
	PIC-Wert	0,26										-
PR-39 MS 1	Beobachtete Allele	14	15	16	17	19	20	21	22	23	24	10
	Anzahl	1	31	17	4	9	21	8	1	3	1	96
	Frequenz [%]	1,0	32,3	17,7	4,2	9,4	21,9	8,3	1,0	3,1	1,0	100
	PIC-Wert	0,77										-

Gen / Markername					Summe
TLR1/6/10 MS 1	Beobachtete Allele	10	11	14	3
	Anzahl	50	2	48	100
	Frequenz [%]	50	2	48	100
	PIC-Wert	0,40			-

TLR1/6/10 MS 3	Beobachtete Allele	9	11	13	14	15	17	18	20	21	25	27	28	29	30	32	15
	Anzahl	1	10	20	1	37	2	7	2	9	3	5	2	1	2	2	104
	Frequenz [%]	1	9,6	19	1	35	1,9	6,7	1,9	8,7	2,9	4,8	1,9	1	1,9	1,9	100
	PIC-Wert	0,79															-

TLR2 MS 1	Beobachtete Allele	10	11	12	3
	Anzahl	2	98	4	104
	Frequenz [%]	1,9	94	3,8	100
	PIC-Wert	0,11			-

TLR2 MS 5	Beobachtete Allele	6	10	11	14	4
	Anzahl	1	64	32	1	98
	Frequenz [%]	1,0	65,3	32,7	1,0	100
	PIC-Wert	0,38				-

TLR3 MS 1	Beobachtete Allele*	10	16	17	18	18,5	19	20	7
	Anzahl	20	1	9	24	2	20	6	82
	Frequenz [%]	24,4	1,2	10,9	29,4	2,4	24,4	7,4	100
	PIC-Wert	0,74							-

*teilweise unterbrochene Motive aufgrund von Leserasterverschiebungen

TLR4 MS 1	Beobachtete Allele*	10,5	13	15	16	17	18	19	20	8
	Anzahl	1	2	5	19	12	10	13	2	64
	Frequenz [%]	1,6	3,1	7,8	29,7	18,8	15,6	20,3	3,1	100
	PIC-Wert	0,78								

*teilweise unterbrochene Motive aufgrund von Leserasterverschiebungen

TLR7/8 MS 2	Beobachtete Allele	14	17	20	24	27	30	6
	Anzahl	13	9	30	9	14	27	102
	Frequenz [%]	13	9	28	8	14	28	100
	PIC-Wert	0,76						-

TLR9 MS 1	Beobachtete Allele	9	10	11	11+1	12	13	14	7
	Anzahl	5	16	34	4	4	6	5	74
	Frequenz [%]	6,8	21,6	45,9	5,4	5,4	8,1	6,8	100
	PIC-Wert	0,69							

*teilweise unterbrochene Motive aufgrund von Leserasterverschiebungen

TNFRSF1B/8 MS 1	Beobachtete Allele	10	11	12	18	4
	Anzahl	22	65	14	3	104
	Frequenz [%]	21,1	62,5	13,5	2,9	100
	PIC-Wert	0,49				-

Gen / Markername												Summe	
IFNGR1 MS 3	Beobachtete Allele	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	10	
	Anzahl	4	1	5	7	36	5	2	27	1	8	96	
	Frequenz [%]	4,2	1,0	5,2	7,3	37,5	5,2	2,1	28,1	1,0	8,3	100	
	PIC-Wert	0,73											-
IFNAR1/ IFNGR2 MS 2	Beobachtete Allele	9	13	14	15	16	17	6					
	Anzahl	32	31	9	9	3	14	98					
	Frequenz [%]	32,7	31,6	9,2	9,2	3,1	14,3	100					
	PIC-Wert	0,72											-
IFNAR1/ IFNGR2 MS 4	Beobachtete Allele	10	11	14	16	4							
	Anzahl	78	6	10	8	102							
	Frequenz [%]	76,5	5,9	9,8	7,8	100							
	PIC-Wert	0,37											-
CXCR2 MS 1	Beobachtete Allele	10	11	15	16	17	18	22	23	24	32	10	
	Anzahl	54	5	3	3	8	11	3	1	1	1	90	
	Frequenz [%]	60	5,5	3,3	3,3	8,8	12,2	3,3	1,1	1,1	1,1	100	
	PIC-Wert	0,59											-
IL12RB2/ IL23R MS 1	Beobachtete Allele	10	11	12	13	14	5						
	Anzahl	32	5	1	40	10	88						
	Frequenz [%]	36,4	5,7	1,1	45,5	11,4	100						
	PIC-Wert	0,58											-
IL12RB2/ IL23R MS 3b	Beobachtete Allele	11	12	13	15	18	19	6					
	Anzahl	21	11	9	2	4	43	90					
	Frequenz [%]	23,3	12,2	10	2,2	4,4	47,7	100					
	PIC-Wert	0,65											-
IL18R1 MS 6	Beobachtete Allele	10	11	12	21	23	25	32	7				
	Anzahl	22	4	67	2	3	2	6	106				
	Frequenz [%]	20,8	3,8	63,2	1,9	2,8	1,9	5,7	100				
	PIC-Wert	0,51											-
CD40 MS 3	Beobachtete Allele	10	13	15	19	21	22	24	33	36	9		
	Anzahl	11	1	13	44	7	1	7	16	4	104		
	Frequenz [%]	10,6	0,96	12,5	42,3	6,7	0,96	6,7	15,4	3,8	100		
	PIC-Wert	0,74											-
TNFRSF11B MS 3	Beobachtete Allele	10	11	19	21	22	28	29	30	31	32	10	
	Anzahl	52	12	5	1	3	4	1	4	8	8	98	
	Frequenz [%]	53,1	12,2	5,1	1	3,1	4,1	1	4,1	8,2	8,2	100	
	PIC-Wert	0,66											-

Gen / Markername													Summe
TNFRSF12A MS 6n	Beobachtete Allele	10	20	21	22	23	26						6
	Anzahl	11	6	59	23	2	1						102
	Frequenz [%]	10,8	5,9	57,8	22,5	1,96	0,98						100
	PIC-Wert	0,55										-	
TNF α/β MS 1	Beobachtete Allele	9	10	11	12	13	14	16	17	18	19	23	11
	Anzahl	2	21	19	7	5	1	1	9	8	25	2	100
	Frequenz [%]	2	21	19	7	5	1	1	9	8	25	2	100
	PIC-Wert	0,81										-	
NRAMP1 MS 1	Beobachtete Allele	11			12			16			3		
	Anzahl	70			30			2			102		
	Frequenz [%]	68,6			29,4			1,96			100		
	PIC-Wert	0,36										-	

6.7 Allelverteilungen in den Kohorten

Die folgenden zwei Tabellen 23 und 24 enthalten die Rohdaten zu den Allelverteilungen der 12 Marker, die für die Genotypisierungen aller Kohorten verwendet wurden. Zu jedem Marker sind die aufgetretenen Allele mit den zugehörigen Beobachtungszahlen in der jeweiligen Kohorte angegeben.

Tabelle 23: Rohdaten der Allelbeobachtungszahlen zur Gesamt-PIC-Wertberechnung 12 ausgewählter Marker

Marker	Allele ↓	Kohorten												Σ	[%]	
		Ktr.	WS	L	SH	WoS	ML	BB	AS	VS	Herd.	Pt.	Hp.			DL
Tyk2 MS2	10	52	14	10	14	30	3	0	3	78	54	-	0	33	291	50,2
	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0,17
	12	51	26	14	18	0	3	4	5	54	52	-	42	17	286	49,3
	13	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	-	0	0	2	0,34
	Σ	104	40	24	32	30	8	4	8	132	106	-	42	50	580	100
CD95 MS 5	10	13	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	21	3,4
	11	26	0	4	1	4	0	0	1	30	24	23	18	1	132	21,4
	13	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,32
	17	0	7	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	9	1,46
	17,5	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	7	1,14
	18	0	1	1	2	0	3	0	0	9	3	0	4	0	23	3,73
	18,5	6	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	10	1,62
	19	6	6	1	0	0	0	0	0	5	21	23	5	5	73	11,85
	19,5	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0,65
	20	3	17	0	0	0	0	0	1	7	11	4	0	7	50	8,12
	20,5	3	0	0	3	0	0	0	0	6	1	0	0	0	13	2,11
	21	6	4	3	16	20	0	0	0	10	1	3	0	0	65	10,55
	21,5	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	4	0,65
	22	6	3	0	0	0	0	2	0	9	1	0	0	0	21	3,4
	22,5	5	0	11	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	26	4,22
23	7	0	3	0	0	0	1	0	28	35	2	6	37	119	19,3	
23,5	1	0	0	0	0	0	0	0	2	3	1	8	0	15	2,44	
24	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	3	0,49	
24,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,16	
25	4	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	1,62	
25,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0,16	
26	0	0	0	4	0	0	0	0	3	0	0	0	0	7	1,14	
Σ	88	40	24	32	32	8	4	8	130	102	56	42	50	616	100	
TF MS 1	6	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,3
	8	0	0	2	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	8	1,22
	9	0	0	1	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	5	0,76

Marker	Allele ↓	Kohorten														Σ	[%]
		Ktr.	WS	L	SH	WoS	ML	BB	AS	VS	Herd.	Pt.	Hp.	DL			
TF MS 1	10	28	2	10	11	0	4	28	0	35	23	11	18	21	191	29,11	
	11	19	12	10	6	0	0	0	3	23	47	5	19	35	179	27,29	
	12	0	15	0	4	0	0	0	4	2	0	0	0	0	25	3,8	
	13	14	1	0	0	0	0	0	1	9	2	5	0	0	32	4,88	
	14	5	2	0	0	1	0	3	0	3	0	1	0	0	15	2,29	
	15	16	4	0	0	2	1	3	0	25	14	13	0	8	86	13,1	
	16	18	0	1	1	1	1	0	0	31	18	21	5	2	98	14,94	
	17	2	0	0	0	0	1	0	0	3	2	0	0	4	12	1,83	
	19	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,46	
	Σ	102	40	24	32	4	4	8	32	8	132	106	56	42	656	100	
	TFR2 MS 1	10	12	0	0	0	0	6	0	0	2	0	0	0	0	20	3,14
		14	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,16
		15	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,63
		16	14	0	0	3	0	0	0	0	7	11	3	0	5	43	6,83
		17	17	5	1	3	22	0	1	2	17	4	11	0	0	83	13,14
		18	4	24	5	0	0	2	0	0	5	0	0	0	0	40	6,35
		19	7	5	0	1	0	0	0	0	7	1	1	0	0	22	3,49
		20	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0,48
		21	16	0	6	15	8	0	0	2	30	48	3	33	33	197	31,27
22		27	0	11	6	0	0	0	0	56	39	38	9	10	199	31,59	
23		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,16	
25		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,16	
26		4	0	1	4	0	0	0	1	3	3	0	0	0	16	2,54	
Σ		102	40	24	32	30	30	8	4	8	130	106	56	42	630	100	
TLR4 MS 1		10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0,34	
		10,5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,17	
		12	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0,50	
	13	2	11	0	0	5	1	0	0	3	0	0	0	0	22	3,69	
	14	0	0	0	0	0	0	0	0	13	4	0	0	3	20	3,36	
	15	5	1	0	0	4	0	0	1	8	1	8	0	0	28	4,7	
	16	19	8	4	6	0	0	1	0	29	31	14	0	29	141	23,66	
17	12	6	10	20	0	0	7	1	33	55	5	41	18	209	35,1		

Marker	Allele ↓	Kohorten														Σ	[%]	
		Ktr.	WS	L	SH	WoS	ML	BB	AS	VS	Herd.	Pt.	Hp.	DL				
TLR4 MS 1	18	10	11	1	0	14	0	0	0	1	0	8	2	2	0	0	49	8,22
	19	13	0	7	6	0	0	0	0	1	6	39	12	25	0	0	109	18,3
	20	2	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	1,85
	25	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,17
	Σ	64	38	22	32	32	8	4	8	136	106	54	42	50	596	100		
IFNGR1 MS 3	10	4	0	0	0	0	0	0	15	21	15	24	0	79	12,5			
	11	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	0,47			
	12	5	0	3	1	1	2	0	10	31	5	16	18	92	14,56			
	13	7	0	6	0	0	2	0	21	15	6	2	8	67	10,6			
	14	36	6	1	4	1	1	0	31	5	17	0	0	102	16,1			
	15	5	0	0	0	0	0	0	10	5	5	0	2	27	4,27			
	16	2	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	3,0			
	17	27	13	10	18	1	0	0	30	21	3	0	22	150	23,73			
	18	1	1	0	9	1	0	12	3	2	0	0	0	32	5,06			
	19	0	3	4	0	0	3	20	0	2	0	0	0	32	5,06			
	20	8	0	0	0	0	0	0	10	6	5	0	0	29	4,59			
Σ	96	40	24	32	4	8	32	8	134	106	56	42	50	632	100			
IFNAR1 IFNGR2 MS 2	9	32	0	1	1	0	0	3	34	25	22	4	15	137	22,1			
	10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,16			
	11	0	1	0	2	0	0	0	8	5	7	0	0	26	4,19			
	12	0	3	3	0	0	3	0	0	16	0	25	0	50	8,06			
	13	31	15	6	28	30	0	0	4	19	9	4	7	185	29,83			
	14	9	14	2	0	0	0	0	12	14	10	9	0	70	11,29			
	15	9	6	9	0	0	0	1	12	22	0	0	26	86	13,87			
	16	3	1	0	0	0	5	0	1	1	0	0	2	13	2,1			
	17	14	0	3	1	0	0	0	19	4	4	0	0	45	7,26			
	19	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0,32			
	20	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0,81			
Σ	98	40	24	32	30	8	4	8	126	106	52	42	50	620	100			
CXCR2 MS 1	9	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0,32			

Marker	Allele ↓	Kohorten														Σ	[%]
		Ktr.	WS	L	SH	WoS	ML	BB	AS	VS	Herd.	Pt.	Hp.	DL			
CXCR2 MS 1	10	54	3	1	19	14	0	1	5	52	49	33	42	16	289	46,3	
	11	5	0	0	1	0	0	0	0	10	24	13	0	11	64	10,26	
	15	3	0	3	1	0	3	0	1	2	0	0	0	0	13	2,08	
	16	3	0	0	5	3	0	0	0	10	0	0	0	0	21	3,37	
	17	8	10	0	0	15	0	0	0	14	2	7	0	0	56	8,97	
	18	11	5	12	2	0	5	3	2	30	16	3	0	6	95	15,22	
	19	0	10	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	12	1,92	
	20	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,96	
	21	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,80	
	22	3	0	7	2	0	0	0	0	5	4	0	0	1	22	3,53	
	23	1	0	0	2	0	0	0	0	8	9	0	0	16	36	5,77	
	24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,16	
	25	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,16	
32	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,16		
Σ		90	40	24	32	32	8	4	8	132	106	56	42	50	624	100	
TNFR SF11B MS 3	10	52	22	20	18	24	0	3	4	77	62	33	13	34	362	57,28	
	11	12	3	0	0	8	0	1	0	12	4	13	0	0	53	8,39	
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	4	0,63	
	19	5	13	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	7	28	4,43	
	21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,16	
	22	3	0	0	0	0	0	0	3	4	1	1	0	0	12	1,9	
	25	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,32	
	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,16	
	27	0	0	0	1	0	0	8	0	0	2	16	0	27	54	8,54	
	28	4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	5	0,79	
	29	1	0	0	0	0	0	0	0	10	4	2	0	2	19	3,0	
	30	4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	6	0,95	
	31	8	0	2	0	0	0	0	0	11	8	3	0	7	39	6,17	
32	8	0	2	13	0	0	0	0	1	11	7	2	2	46	7,28		
Σ		98	40	24	32	32	8	4	8	132	106	56	42	50	632	100	

Marker	Allele ↓	Kohorten													Σ	[%]
		Ktr.	WS	L	SH	WoS	ML	BB	AS	VS	Herd.	Pt.	Hp.	DL		
TNFR SF12A MS 6n	10	11	0	0	1	3	8	0	0	12	1	2	0	0	38	6,07
	14	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1,28
	19	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,48
	20	6	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	10	1,6
	21	59	13	14	12	15	0	3	8	59	57	43	7	30	320	51,1
	22	23	1	5	16	13	0	1	0	51	48	9	31	20	218	34,8
	23	2	1	5	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	10	1,6
	24	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,48
	25	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,32
	26	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	4	0,64
27	0	7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1,28	
29	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,32	
Σ	102	38	24	32	32	8	4	8	130	106	54	38	50	626	100	
TNF α/β MS 1	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,32	
	10	21	1	6	3	0	0	3	19	31	12	5	20	121	19,27	
	11	19	12	15	1	24	1	0	31	27	12	5	23	170	27,1	
	12	7	14	0	0	0	5	0	6	0	0	0	0	32	5,1	
	13	5	0	0	0	0	2	0	3	0	0	4	0	14	2,23	
	14	1	0	0	11	6	0	0	8	21	0	24	0	71	11,3	
	16	1	0	0	8	0	0	0	13	6	7	0	0	35	5,57	
	17	9	2	1	0	0	0	0	5	6	10	0	0	33	5,25	
	18	8	0	0	6	0	0	0	20	6	4	0	7	51	8,12	
	19	25	6	2	3	0	0	2	25	9	11	0	0	84	13,38	
20	0	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	7	1,11		
23	2	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	8	1,27		
Σ	100	40	24	32	32	8	4	6	132	106	56	38	50	628	100	

Marker	Allele ↓	Kohorten														Σ	[%]	
		Ktr.	WS	L	SH	WoS	ML	BB	AS	VS	Herd.	Pt.	Hp.	DL				
NRAMP1 MS 1	10	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1,58
	11	70	6	20	22	17	8	4	6	85	72	50	25	43	428	67,5		
	12	30	17	4	10	0	0	0	2	38	24	6	0	7	138	21,77		
	16	2	3	0	0	2	0	0	0	4	0	0	0	0	11	1,74		
	17	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	13	2,05		
	18	0	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	5	0,79		
	19	0	6	0	0	0	0	0	0	4	8	0	15	0	33	5,21		
	Σ	102	40	24	32	32	8	4	8	132	106	56	40	50	634	100		

Tabelle 24: Rohdaten der Allelbeobachtungszahlen innerhalb der Elterntiere zu den Infektionsversuchstieren an 12 Markerloci

Marker	Allele ↓	Kohorten													
		Eltern Pt.					Eltern Hp.					Eltern DL			
Tyk2 MS 2	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	13
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42	-	-	-	9
	Σ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42	-	-	-	22
CD95 MS 5	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	20	16	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	1	1
	18	0	4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
	19	17	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	1	1
	20	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
	20,5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	23	2	6	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	16
	23,5	1	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
	24,5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Σ	52	42	0	0	0	0	0	0	42	0	0	0	0	22	

Marker	Allele ↓	Kohorten		
		Eltern Pt.	Eltern Hp.	Eltern DL
TF MS 1	10	8	20	8
	11	3	17	18
	13	5	0	0
	14	1	0	1
	15	14	1	4
	16	20	4	3
	17	1	0	4
	Σ	52	42	38
TFR2 MS 2	16	2	0	2
	17	8	0	0
	19	1	0	0
	21	4	29	14
	22	36	13	6
	25	1	0	0
	Σ	52	42	22
	TLR4	10	0	2
14		0	0	3
15		5	0	0
16		11	3	9
17		6	37	10
18		1	0	0
19		29	0	0
Σ		52	42	22
IFNGR1 MS 3	10	9	27	1
	12	6	14	5
	13	4	1	4
	14	13	0	0
	15	5	0	1
	17	6	0	11
	18	1	0	0
	Σ	52	42	22

Marker	Allele ↓	Kohorten		
		Eltern Pt.	Eltern Hp.	Eltern DL
IFNAR1//IFNGR2 MS 2	9	16	4	7
	11	8	0	0
	12	0	23	0
	13	11	4	3
	14	11	11	0
	15	0	0	11
	16	0	0	1
	17	6	0	0
	Σ	52	42	22
CXCR2 MS 1	9	0	1	0
	10	29	41	5
	11	9	0	6
	16	1	0	0
	17	8	0	0
	18	4	0	5
	22	0	0	1
	23	1	0	5
	Σ	52	42	22
TNFRSF11B MS 3	10	33	15	12
	11	9	0	0
	18	2	0	0
	19	0	0	4
	22	1	0	0
	27	0	22	0
	29	2	0	2
	31	3	0	3
	32	2	5	1
	Σ	52	42	22
TNFRSF12A MS 6n	10	2	0	0
	21	38	11	15
	22	12	31	7
	Σ	52	42	22

Marker	Allele ↓	Kohorten		
		Eltern Pt.	Eltern Hp.	Eltern DL
TNF α/β MS 1	10	11	9	9
	11	7	4	11
	13	0	9	0
	14	0	20	0
	16	10	0	0
	17	8	0	0
	18	4	0	2
	19	12	0	0
	Σ	52	42	22
NRAMP1 MS 1	11	45	31	19
	12	7	0	3
	19	0	11	0
	Σ	52	42	22

Ktr.: Kontrollkohorte
 WS: Wildschweine
 L: Leicoma
 SH: Schwäbisch-Hällische Schweine
 WoS: Wollschweine
 ML: Mini.-Lewe
 BB: Bunte Bentheimer
 AS: Angler Sattelschweine
 VS: Verbraucherstudie
 Herd.: Herdlinienfriere
 Pt. Pietrain
 Hp.: Hampshire
 DL: Deutsche Landrasse

6.8 p-Werte

Der folgenden Tabelle sind die p-Werte aus den Algorithmen T2, T3 und T4 der Clump-Software als ergänzende Information zu Kapitel 3.3.5.5 zu entnehmen.

Tabelle 25: p-Werte aus den Algorithmen T2, T3 und T4

Gen / Markername	Vergleich	p-Wert aus T2	p-Wert aus T3	p-Wert aus T4
Tyk2 MS 2	VS – WS	0,010690	0,010530	0,010530
	VS – L	0,121749	0,123209	0,123209
	VS – SH	0,164978	0,162838	0,162838
	VS – Herd.	0,238178	0,239018	0,239018
	VS – Pt.	-	-	-
	VS – Hp.	0,00001	0,00001	0,00001
	VS – DL	1,00000	1,00000	1,00000
CD95 MS 5	VS – WS	0,00001	0,00001	0,00001
	VS – L	0,009800	0,600844	0,000370
	VS – SH	0,00001	0,00001	0,00001
	VS – Herd.	0,00001	0,000250	0,00001
	VS – Pt.	0,00001	0,00001	0,00001
	VS – Hp.	0,00004	0,137389	0,00006
	VS – DL	0,00001	0,00001	0,00031
Transferrin MS 1	VS – WS	0,00001	0,002750	0,00001
	VS – L	0,105659	0,018580	0,002530
	VS – SH	0,002180	0,039000	0,002670
	VS – Herd.	0,000080	0,000020	0,000280
	VS – Pt.	0,045210	0,128239	0,054239
	VS – Hp.	0,00002	0,008550	0,00009
	VS – DL	0,002370	0,00089	0,00058
TFR2 MS 1	VS – WS	0,00001	0,00001	0,00001
	VS – L	0,919191	0,959820	0,364106
	VS – SH	0,010050	0,017050	0,017530
	VS – Herd.	0,000050	0,000850	0,000500
	VS – Pt.	0,003420	0,00482	0,01489
	VS – Hp.	0,00001	0,00001	0,0001
	VS – DL	0,0003	0,00043	0,02558
TLR4 MS 1	VS – WS	0,00001	0,000340	0,00001
	VS – L	0,053089	0,080909	0,359256
	VS – SH	0,000140	0,000160	0,001870
	VS – Herd.	0,00001	0,000030	0,00001
	VS – Pt.	0,00255	0,00192	0,00359
	VS – Hp.	0,00001	0,00001	0,00001
	VS – DL	0,00296	0,013710	0,01079
IFNGR1 MS 3	VS – WS	0,000060	0,350786	0,00001
	VS – L	0,000160	0,071119	0,003160
	VS – SH	0,000430	0,000570	0,000020
	VS – Herd.	0,00001	0,000020	0,000060
	VS – Pt.	0,147459	0,335717	0,222998
	VS – Hp.	0,00001	0,00001	0,00001
	VS – DL	0,00038	0,00982	0,01469

Tabelle 25: p-Werte aus den Algorithmen T2, T3 und T4 (Fortsetzung)

Gen / Markenname	Vergleich	p-Wert aus T2	p-Wert aus T3	p-Wert aus T4
IFNAR1 / IFNGR2 MS 2	VS - WS	0,000040	0,000710	0,00001
	VS - L	0,027670	0,034800	0,000750
	VS - SH	0,00001	0,00001	0,00001
	VS – Herd.	0,00001	0,000020	0,000160
	VS – Pt.	0,225788	0,132589	0,106609
	VS – Hp.	0,00001	0,00001	0,00001
	VS - DL	0,01615	0,410366	0,00033
CXCR2 MS 1	VS - WS	0,00001	0,000860	0,00001
	VS - L	0,001190	0,001090	0,00002
	VS - SH	0,032140	0,068659	0,038430
	VS – Herd.	0,000250	0,004210	0,000850
	VS – Pt.	0,00153	0,069369	0,00454
	VS – Hp.	0,00001	0,00001	0,00001
	VS - DL	0,279877	0,281867	0,008640
TNFRSF11B MS 3	VS - WS	0,000020	0,722143	0,00001
	VS - L	0,022380	0,022230	0,274857
	VS - SH	0,845692	0,843002	0,001970
	VS – Herd.	0,003080	0,000550	0,004340
	VS – Pt.	0,183988	0,230238	0,544525
	VS – Hp.	0,00001	0,00001	0,00001
	VS - DL	0,817322	0,816762	0,020870
TNFRSF12A MS 6n	VS - WS	0,00001	0,000060	0,00001
	VS - L	0,268667	0,145909	0,001070
	VS - SH	0,433006	0,456235	0,109969
	VS – Herd.	0,000490	0,016340	0,000580
	VS – Pt.	0,002140	0,00148	0,008620
	VS – Hp.	0,00011	0,00026	0,00239
	VS - DL	0,064269	0,095179	0,346937
TNF α/β MS 1	VS - WS	0,085509	0,751312	0,00001
	VS - L	0,000360	0,000350	0,002760
	VS - SH	0,022590	0,031300	0,000180
	VS – Herd.	0,000030	0,006240	0,000060
	VS – Pt.	0,183018	0,371006	0,00972
	VS – Hp.	0,00001	0,00001	0,00001
	VS - DL	0,00122	0,01694	0,00169
NRAMP1 MS 1	VS - WS	0,00001	0,00001	0,00001
	VS - L	0,094969	0,106159	0,415756
	VS - SH	0,686893	0,814792	0,646454
	VS – Herd.	0,492875	0,295287	0,352386
	VS – Pt.	0,00345	0,005210	0,02411
	VS – Hp.	0,347807	0,00017	0,0001
	VS - DL	0,04812	0,069359	0,325027

VS: Verbraucherstudie

WS: Wildschwein

L: Leicoma

SH: Schwäbisch-Hällische Schweine

Herd.: Herdlinientiere der BHZP

Pt.: Pietrain (Eltern der Ferkel aus den Infektionsversuchen)

Hp.: Hampshire (Eltern der Ferkel aus den Infektionsversuchen)

DL: Deutsche Landrasse (Eltern der Ferkel aus den Infektionsversuchen)

6.9 Infektionsversuche: Familienstruktur und Rankingwerte

Tabelle 26: Familienstrukturen und Rankingwerte der Tiere aus den Infektionsversuchen

Deutsche Landrasse					
Familie		FUGATO-Tier	Interne Isolationsnummer	Rankingwert	Mittelwert
1	Mutter	Sau 85	S 226	-	56,4
	Vater	60129269	S 411	-	
	Ferkel 1	69	S 401	89,75	
	Ferkel 2	63	S 399	89,95	
	Ferkel 3	74	S 334	26,65	
	Ferkel 4	65	S 400	40,01	
	Ferkel 5	64	S 444	44,81	
	Ferkel 6	62	S 343	89,95	
	Ferkel 7	67	S 328	44,61	
	Ferkel 8	72	S 337	5,56	
	Ferkel 9	71	S 402	76,62	
2	Mutter	Sau 21	S 209	-	1,31
	Vater	31223373	S 375	-	
	Ferkel 1	37	S 282	1,71	
	Ferkel 2	38	S 283	0,91	
3	Mutter	Sau 221	S 210	-	63,2
	Vater	62096862	S 398	-	
	Ferkel 1	77	S 345	95,61	
	Ferkel 2	82	S 350	95,40	
	Ferkel 3	83	S 367	63,14	
	Ferkel 4	84	S 445	23,00	
	Ferkel 5	76	S 344	95,35	
	Ferkel 6	75	S 359	6,59	
4	Mutter	Sau 1298	S 212	-	1,73
	Vater	61764775	S 383	-	
	Ferkel 1	33	S 280	2,70	
	Ferkel 2	32	S 279	0,76	

Familie		FUGATO-Tier	Interne Isolationsnummer	Rankingwert	Mittelwert
5	Mutter	Sau 221	S 210	-	1,44
	Vater	61764775	S 383	-	
	Ferkel 1	35	S 281	1,21	
	Ferkel 2	30	S 278	1,67	
6	Mutter	Sau 261	S 211	-	1,2
	Vater	31222367	S 387	-	
	Ferkel 1	31	S 219	1,64	
	Ferkel 2	36	S 221	0,76	
7	Mutter	Sau 19	S 208	-	9,25
	Vater	31223373	S 375	-	
	Ferkel 1	34	S 220	3,47	
	Ferkel 2	29	S 218	15,03	
8	Mutter	Sau 368	S 440	-	27,4
	Vater	62277934	S 434	-	
	Ferkel 1	87	S 425	41,99	
	Ferkel 2	93	S 428	12,88	
9	Mutter	Sau 245	S 439	-	9,85
	Vater	31304363	S 435	-	
	Ferkel 1	88	S 426	14,59	
	Ferkel 2	91	S 427	5,11	
10	Mutter	Sau 309	S 518	-	16,4
	Vater	61975116	S 534	-	
	Ferkel 1	106	S 492	42,38	
	Ferkel 2	110	S 496	1,39	
	Ferkel 3	117	S 527	5,53	
11	Mutter	Sau 84	S 520	-	23,3
	Vater	70922422	S 531	-	
	Ferkel 1	109	S 495	15,74	
	Ferkel 2	113	S 523	15,83	
	Ferkel 3	116	S 526	38,43	
Pietrain					
12	Mutter	Sau 745	S 517	-	42,2
	Vater	62358585	S 529	-	
	Ferkel 1	118	S 528	81,17	
	Ferkel 2	112	S 522	3,17	

Familie		FUGATO-Tier	Interne Isolationsnummer	Rankingwert	Mittelwert
13	Mutter	Sau 722	S 355	-	46,14
	Vater	9819566	S 433	-	
	Ferkel 1	57	S 320	46,14	
14	Mutter	Sau 720	S 356	-	34,5
	Vater	9853037	S 369	-	
	Ferkel 1	53	S 317	37,97	
	Ferkel 2	56	S 319	31,00	
15 15	Mutter	Sau 688	S 353	-	28,41
Vater	21406657	S 386	-		
Ferkel 1	52	S 307	28,41		
16	Mutter	Sau 450	S 441	-	24,71
	Vater	61907283	S 430	-	
	Ferkel 1	94	S 451	29,67	
	Ferkel 2	90	S 449	19,75	
17	Mutter	Sau 697	S 357	-	29,28
	Vater	21406657	S 386	-	
	Ferkel 1	61	S 310	29,28	
18	Mutter	Sau 744	S 354	-	30,30
	Vater	9793415	S 443	-	
	Ferkel 1	58	S 321	30,30	
19	Mutter	Sau 722	S 355	-	13,4
	Vater	62358585	S 529	-	
	Ferkel 1	114	S 524	23,83	
	Ferkel 2	111	S 521	2,92	
20	Mutter	Sau 645	fehlt	-	20,02
	Vater	21406657	S 386	-	
	Ferkel 1	54	S 308	20,02	
21	Mutter	Sau 572	S 358	-	23,40
	Vater	9857749	S 431	-	
	Ferkel 1	59	S 309	23,40	
22	Mutter	Sau 448	S438	-	11,3
	Vater	62337761	S 532	-	
	Ferkel 1	89	S 448	11,36	
	Ferkel 2	86	S 447	11,27	

Familie		FUGATO-Tier	Interne Isolationsnummer	Rankingwert	Mittelwert
23	Mutter	Sau 516	fehlt	-	5,7
	Vater	9901505	S 536	-	
	Ferkel 1	115	S 525	9,89	
	Ferkel 2	107	S 493	1,42	
24	Mutter	Sau 497	fehlt	-	13,88
	Vater	9853037	S 369	-	
	Ferkel 1	60	S 322	13,88	
25	Mutter	Sau 721	fehlt	-	7,42
	Vater	9895087	S 436	-	
	Ferkel 1	55	S 318	7,42	
26	Mutter	Sau 511	S 519	-	3,2
	Vater	9796624	S 537	-	
	Ferkel 1	108	S 494	3,69	
	Ferkel 2	105	S 491	2,72	
27	Mutter	Sau 507	S 456	-	0,33
	Vater	9796624	S 537	-	
	Ferkel 1	99	S 485	0,33	
	Ferkel 2	95	S 481	0,33	
28	Mutter	Sau 710	S 455	-	1,75
	Vater	9930868	S 538	-	
	Ferkel 1	102	S 488	3,33	
	Ferkel 2	96	S 482	0,17	
29	Mutter	Sau 456	S 437	-	3,7
	Vater	21406152	S 432	-	
	Ferkel 1	92	S 450	4,59	
	Ferkel 2	85	S 446	2,79	
Hampshire					
30	Mutter	Sau 927	S 270/452	-	11,2
	Vater	62246806	S 533	-	
	Ferkel 1	101	S 487	21,89	
	Ferkel 2	98	S 484	0,50	
31	Mutter	Sau 803	S 351	-	10,1
	Vater	62025770	S 390	-	
	Ferkel 1	78	S 346	17,17	
	Ferkel 2	79	S 347	3,00	
32	Mutter	Sau 857	S 342	-	6,8
	Vater	62088612	S 397	-	
	Ferkel 1	80	S 348	12,17	
	Ferkel 2	81	S 349	1,50	

Familie		FUGATO-Tier	Interne Isolationsnummer	Rankingwert	Mittelwert
33	Mutter	Sau 923	S 287	-	5,8
	Vater	52000874	S 374	-	
	Ferkel 1	50	S 305	9,56	
	Ferkel 2	51	S 306	2,06	
34	Mutter	Sau 981	S 340	-	6,7
	Vater	61902995	S 442	-	
	Ferkel 1	70	S 333	10,12	
	Ferkel 2	68	S 332	3,35	
35	Mutter	Sau 922	S 269	-	3,8
	Vater	61912374	S 382	-	
	Ferkel 1	42	S 284	6,33	
	Ferkel 2	43	S 285	1,33	
36	Mutter	Sau 961	S 254	-	3,1
	Vater	52108966	S 379	-	
	Ferkel 1	45	S 301	4,83	
	Ferkel 2	44	S 300	1,33	
37	Mutter	Sau 864	S 341	-	9,17
	Vater	62089826	S 429	-	
	Ferkel 1	73	S 403	9,17	
38	Mutter	Sau 927	S 270/452	-	1,4
	Vater	52000874	S 374	-	
	Ferkel 1	48	S 261	1,33	
	Ferkel 2	49	S 304	1,39	
39	Mutter	Sau 904	S 255	-	1,00
	Vater	52000874	S 374	-	
	Ferkel 1	47	S 303	1,00	
40	Mutter	Sau 805	S 453	-	0,5
	Vater	62400775	S 535	-	
	Ferkel 1	103	S 489	0,50	
	Ferkel 2	100	S 486	0,50	
41	Mutter	Sau 910	S 454	-	0,33
	Vater	62333562	S 530	-	
	Ferkel 1	104	S 490	0,33	
Large White					
42	Mutter	Sau 491	fehlt	-	14,1
	Vater	52261286	S 670	-	
	Ferkel 1	133	S 562	0,76	
	Ferkel 2	134	S 563	7,63	
	Ferkel 3	138	S 579	33,81	

Familie		FUGATO-Tier	Interne Isolationsnummer	Rankingwert	Mittelwert
43	Mutter	Sau 416	S 678	-	0,91
	Vater	52447083	S 671	-	
	Ferkel 1	137	S 578	0,91	
44	Mutter	Sau 508	S 641	-	0,32
	Vater	52261286	S 670	-	
	Ferkel 1	139	S 580	0,32	
45	Mutter	Sau 505	S 638	-	0,91
	Vater	52464476	S 669	-	
	Ferkel 1	144	S 585	0,91	
46	Mutter	Sau 412	S 640	-	0,91
	Vater	52447083	S 671	-	
	Ferkel 1	140	S 581	0,91	
47	Mutter	Sau 514	S 634	-	0,91
	Vater	52708104	S 673	-	
	Ferkel 1	142	S 583	0,91	
48	Mutter	Sau 418	fehlt	-	16,1
	Vater	52377033	S 668	-	
	Ferkel 1	135	S 564	3,91	
	Ferkel 2	136	S 565	28,23	
49	Mutter	Sau 428	S 639	-	6,06
	Vater	52299773	S 674	-	
	Ferkel 1	143	S 584	6,06	
50	Mutter	Sau 496	S 677	-	10,66
	Vater	52261286	S 670	-	
	Ferkel 1	131	S 560	10,66	
51	Mutter	Sau 413	S 636	-	10,25
	Vater	6879936	S 672	-	
	Ferkel 1	141	S 582	10,25	
52	Mutter	Sau 408	fehlt	-	28,3
	Vater	52377033	S 668	-	
	Ferkel 1	129	S 558	19,34	
	Ferkel 2	132	S 561	37,24	
53	Mutter	Sau 420	S 676	-	27,45
	Vater	52464476	S 669	-	
	Ferkel 1	130	S 559	27,45	

6.9.1 Tierausswahl für FAMHAP: Extreme Phänotypen

Die Tabelle 27 enthält detaillierte Informationen zu den Tieren aus den Infektionsversuchen, die für den Vergleich kontrastierender Phänotypen ausgewählt wurden (siehe 3.5.2.1).

Tabelle 27: Tierausswahl für FAMHAP: Extreme Phänotypen

Am mildesten erkranktes Ferkel pro Familie				Am schwersten erkranktes Ferkel pro Familie			
FUGATO-Tier	Rasse	Rankingwert	Korr. Rangwert	FUGATO-Tier	Rasse	Rankingwert	Korr. Rangwert
96	DL	0,17	1	139	LW	0,32	1
139	LW	0,32	2	99	Pt.	0,33	2,5
95	Pt.	0,33	3,5	104	Hp.	3,40	2,5
104	Hp.	0,33	3,5	103	Hp.	0,50	4
98	Hp.	0,50	5,5	137	LW	0,91	6,5
100	Hp.	0,50	5,5	140	LW	0,91	6,5
32	DL	0,76	8	142	LW	0,91	6,5
36	DL	0,76	8	144	LW	0,91	6,5
133	LW	0,76	8	47	Hp.	1,00	9
38	DL	0,91	12	49	Hp.	1,39	10
137	LW	0,91	12	31	DL	1,64	11
140	LW	0,91	12	30	DL	1,67	12
142	LW	0,91	12	37	DL	1,71	13
144	LW	0,91	12	33	DL	2,70	14
47	Hp.	1,00	15	102	Pt.	3,33	15
35	DL	1,21	16	108	Pt.	3,69	16
43	Hp.	1,33	18	92	Pt.	4,59	17
44	Hp.	1,33	18	45	Hp.	4,83	18
48	Hp.	1,33	18	143	LW	6,06	19
110	DL	1,39	20	42	Hp.	6,33	20
107	Pt.	1,42	21	55	Pt.	7,42	21
81	Hp.	1,50	22	73	Hp.	9,17	22
51	Hp.	2,06	23	50	Hp.	9,56	23
105	Pt.	2,72	24	115	Pt.	9,89	24
85	Pt.	2,79	25	70	Hp.	10,12	25
111	Pt.	2,92	26	141	LW	10,25	26
79	Hp.	3,00	27	131	LW	10,66	27
112	Pt.	3,17	28	89	Pt.	11,36	28
68	Hp.	3,35	29	80	Hp.	12,17	29
34	DL	3,47	30	60	Pt.	13,88	30
135	LW	3,91	31	88	DL	14,59	31
91	DL	5,11	32	29	DL	15,03	32
72	DL	5,56	33	78	Hp.	17,17	33
143	LW	6,06	34	54	Pt.	20,02	34
75	DL	6,59	35	101	Hp.	21,89	35
55	Pt.	7,42	36	59	Pt.	23,40	36
73	Hp.	9,17	37	114	Pt.	23,83	37
141	LW	10,25	38	130	LW	27,45	38
131	LW	10,66	39	136	LW	28,23	39
86	Pt.	11,27	40	52	Pt.	28,41	40
93	DL	12,88	41	61	Pt.	29,28	41
60	Pt.	13,88	42	94	Pt.	29,67	42
109	DL	15,74	43	58	Pt.	30,30	43
129	LW	19,34	44	138	LW	33,81	44
90	Pt.	19,75	45	132	LW	37,24	45
54	Pt.	20,02	46	53	Pt.	37,97	46

Am mildesten erkranktes Ferkel pro Familie				Am schwersten erkranktes Ferkel pro Familie			
FUGATO-Tier	Rasse	Rankingwert	Korr. Rangwert	FUGATO-Tier	Rasse	Rankingwert	Korr. Rangwert
59	Pt.	23,40	47	116	DL	38,43	47
130	LW	27,45	48	87	DL	41,99	48
52	Pt.	28,41	49	106	DL	42,38	49
61	Pt.	29,28	50	57	Pt.	46,14	50
58	Pt.	30,30	51	118	Pt.	81,17	51
56	Pt.	31,00	52	63	DL	89,95	52
57	Pt.	46,14	53	77	DL	95,61	53

DL: Deutsche Landrasse
 Hp.: Hampshire

LW: Large White
 Pt.: Pietrain

In der linken Tabellenhälfte ist für jede der 53 untersuchten Familien jeweils das am mildesten erkrankte Ferkel aufgeführt; in der rechten Hälfte jeweils das am schwersten erkrankte Ferkel jeder Familie.

Rot markiert sind die auf beiden Seiten die Tiere, die für den Vergleich der Genotypen von mild und schwer erkrankten Tieren nach *A. pleuropneumoniae* Infektion mittels FAMHAP-Analyse ausgewählt wurden.

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

1. Daniłowicz E, Martinez-Arias R, Singh M, Probst I, Stanke F, Tümmler B, Höltig D, Waldmann KH, Gerlach GF, Leeb T and the FUGATO-consortium IRAS: Characterization of the porcine transferrin gene (TF) and its association with susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. (Manuskript in Vorbereitung)
2. Höltig D, Hennig-Pauka I, Thies K, Rehm T, Gerlach GF, Waldmann KH und die Mitglieder des FUGATO-Konsortiums IRAS: Vergleich der diagnostischen Aussagekraft klinischer, röntgenologischer und sonographischer Befunde bei der experimentellen Infektion des Schweines mit *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 121(11/12) (2008, in Druck)
3. Höltig D, Hennig-Pauka I, Thies K, Rehm T, Beyerbach M, Gerlach GF, Waldmann KH and the members of the FUGATO-consortiums IRAS: Clinical analysis of distinct susceptibilities to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection within different porcine breeding lines. (Manuskript in Vorbereitung)
4. Rehm T, Benga L, Daniłowicz E, Drungowski M, Höltig D, Kahlisch D, Öhlmann W, Probst I, Gerlach GF et al.. Funktionelle Genomanalyse zur Resistenz gegen Atemwegsinfektionen am Beispiel der *Actinobacillus*-Pleuropneumonie des Schweins. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 115: 260-264 (2008)

Tagungsbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Tagungen präsentiert:

CRWAD (Conference of Research Workers in Animal Diseases),
Chicago, 4. – 6.12.2007

Posterpräsentation: Identification of microsatellite markers in genes which possibly modulate the susceptibility of pigs to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

ICG (XX International Congress of Genetics), Berlin, 12. – 17.07.08,
Posterpräsentation: Diversity of potential genetic modulators regarding the disposition of pigs to respiratory tract infections

Lebenslauf

Name: Inga Probst
Anschrift: Zimmermannstr. 5, 30453 Hannover
Tel.: 0511/ 69 68 69 7
E-Mail: IP@ebx.de

Geburtsdatum: 27.01.1974
Familienstand: ledig

Schulbildung
08/80 - 6/84 Grundschole Eime
08/84 - 6/86 Jugenddorf-Christophorus-Schule Elze
08/86 - 6/93 Gymnasium Alfeld, Abitur

Berufsausbildung
08/93 - 7/94 BGJ Chemie, Physik, Biologie
BBS 22, Hannover
Ausbildung zur Biologielaborantin
Universität Hannover
halbjährlich in den Abteilungen:
- Entomologie / Zoologie
- Botanik, schwerpunktmäßig Molekulargenetik
- Pflanzenernährung
- Mikrobiologie
zweiwöchige Praktika:
- Histologie, MHH, Hannover
- Phytopathologie, Universität Hannover
Abschlußprüfung vor der IHK

Studium
10/96 - 1/97 Pharmazie
Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Frankfurt (Main)
10/99 – 09/05 Biologie (Dipl.)
Universität Hannover
Prüfungsfächer: Genetik, Biochemie, Virologie
10/04 – 07/05 Diplomarbeit am Institut für Virologie
Das Matrix-Protein des Virus der vesikulären
Stomatitis: Expression und Lokalisation in
polarisierten Epithelzellen

Berufstätigkeit
01/97 - 01/98 Technische Assistentin
für die Herstellung und Analytik
von Tumorkvakzinen
Macrolab GmbH, Hannover
06/98 - 09/99 Biologielaborantin
Dr. U. Noack-Laboratorium für angewandte
Biologie, Sarstedt
10/99 - 07/01 studentische Hilfskraft
Dr. U. Noack-Laboratorium für angewandte
Biologie, Sarstedt
07/02 - 09/05 studentische Hilfskraft
Cytonet GmbH & Co. KG NL Hannover
Seit 10/05 Promotion zur Dr. rer. nat. an der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Leibniz
Universität Hannover