

Genetik und Krankheitsresistenz

Genetics and disease resistance

REINER, G.*

Zusammenfassung

Hinweise auf genetische Komponenten der Krankheitsresistenz liegen für die meisten bedeutsamen Krankheiten des Menschen, der Labor- und Nutztiere vor. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings bislang nur in wenigen Fällen erforscht. Gründe hierfür sind der meist polygene Erbgang, das häufige Fehlen geeigneter Tiermodelle sowie die Dominanz der Umwelteffekte (z.B. Infektionsdruck, Immunstatus, Stressoren), die den Blick auf die verantwortlichen Genvarianten erschweren. Auch ethische und praktische Aspekte können die Aufklärung von Resistenzmechanismen innerhalb einer Spezies unmöglich machen. Aufgrund der ausgeprägten Diversität innerhalb und zwischen Nutzierrassen sowie wegen der oft ausgeprägten metabolischen Übereinstimmung mit dem Menschen, aber auch mit dem Ziel der Steigerung von Produktionshygiene, Ökonomie und Tierschutz, kommt der Untersuchung genetischer Krankheitsresistenzen beim Nutztier eine große Bedeutung zu. Im Folgenden soll ein Überblick über Krankheitsresistenzen bei Nutztieren und deren praktische Anwendung gegeben werden, gefolgt von der Darstellung methodischer Ansätze zu deren Erforschung und ergänzt durch Beispiele aus der eigenen Forschungspraxis.

Schlüsselworte: Krankheitsresistenz, Review

Summary

Genetic components of disease resistance have been described in most of important diseases in human as well as in laboratory and livestock animals. ALLERDINGS the basic mechanisms have been established in a few examples only. The reasons herefore are the mostly polygenic inheritance of disease resistance traits, the missing of suitable animal models and the dominance of environmental effects like infection pressure, immune status, and stressors, TRÜBEN the view on responsible gene variants. Ethical and practical aspects may further hinder research on disease resistance in certain species. Livestock animals play a crucial role in disease resistance research, because of distinct genetic diversity within and between breeds, because of an often distinct metabolic congruency with humans, and aiming

towards the improvement of hygiene and economy of production and animal welfare. The following sections will review disease resistance in livestock animals and their practical implications, ERGÄNZT by examples of our own research activities.

Keywords: disease resistance, review

Einführung

Hinweise auf genetische Komponenten der Empfindlichkeit gegenüber Infektionskrankheiten werden schon seit Jahrzehnten erhoben (Übersicht: N.N., 1998). Die dabei zusammengetragenen Resistenzunterschiede betreffen praktisch alle bedeutsamen Erreger von Infektionskrankheiten des Menschen, der Labor- und Haustiere. Während sich die meisten Hinweise auf Resistenzunterschiede auf Beobachtungen von Spezies-, Rassen- und Populationsunterschieden beziehen, gelang die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen nur in wenigen Fällen. Die Begründung liegt in der Tatsache, dass die meisten genetischen Resistenzunterschiede polygen vererbt werden, und dass quantitative Einzelgenwirkungen vor dem Hintergrund dominierender Umwelteffekte erst unter aufwendigen und kontrollierten Versuchsbedingungen sichtbar werden, wie sie unter Feldbedingungen nicht zur Verfügung stehen. Auch das geeignete Tiermodell ist für die Fragestellung entscheidend, denn brauchbare Resistenzunterschiede im Hinblick auf einen bestimmten Erreger können a priori nicht in jeder Tierspezies erwartet werden und analysierbare Resistenzunterschiede treten meist nur zwischen bestimmten Populationen auf, die zuvor identifiziert werden müssen. Bei manchen Spezies mögen auch ethische oder praktische (z.B. die Erstellung von Kreuzungspopulationen, Anstellung gezielter Versuche) Gesichtspunkte gegen die Möglichkeit sprechen, aufgetretene Resistenzunterschiede näher zu untersuchen.

Der Untersuchung genetischer Krankheitsresistenzen an Nutztieren kommt also in mehrfacher Hinsicht eine große Bedeutung zu. Die ausgeprägte genetische Diversität zwischen und innerhalb Rassen und Populationen schafft die Voraussetzung zur Etablierung optimierter Tiermodelle zu deren Studium. Nutztiere bringen den Vorteil mit, dass Kreuzungen zwischen hinsichtlich der Resistenz möglichst maximal divergierenden Rassen möglich sind, um segregierende Populationen erstellen zu können (das sind Populationen in denen die

divergierenden Ausprägungen der Zielmerkmale auch wirklich auftreten), mit denen die Möglichkeit geschaffen wird, Resistenzunterschiede überhaupt detektieren zu können.

Für Assoziationsstudien zur Feinkartierung der entdeckten Gene schließlich, stehen geeignete ausgezüchtete kommerzielle Populationen innerhalb der Nutztierspezies zur Verfügung. Dabei ist die physiologische Übereinstimmung mancher Nutztierspezies, beispielsweise dem Schwein, mit dem Menschen ausgeprägter als die der meisten Laborsäuger im engeren Sinne.

Auch die für Nutztierspezies verfügbaren genetischen und genomischen Informationen beginnen sich langsam an die für Laborspezies vorhandenen anzugleichen. Die DNA-Sequenzierung für das Huhn wurden bereits 2004 abgeschlossen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/chicken>; HILLIER et al., 2004), die Sequenzen für Rind, Schwein und Schaf sollen noch in diesem Jahr fertiggestellt werden (http://www.ensembl.org/Bos_taurus/index.html; www.livestockgenomics.csiro.au/vsheep/; <http://www.piggenome.org/index.php>). Über vergleichende Kartierungen lassen sich damit zukünftig Rückschlüsse vom Nutztier auch auf den Menschen und andere Spezies übertragen.

Untersuchungen zur Krankheitsresistenz: Ziele

Die Bedeutung der Aufklärung genetischer Krankheitsresistenz liegt damit hauptsächlich in der Erarbeitung der zugrundeliegenden molekularen Abwehr- und Pathogenesemechanismen. Es steht zu erwarten, dass sich mit dem vertieften Verständnis der beteiligten Faktoren und der Auswirkungen unterschiedlicher Genvarianten Wege für neue Diagnostik-, Therapie- und Prophylaxekonzepte eröffnen werden. Dabei ist insbesondere an die Entwicklung von Genmarkern und modernen, die Immunitätsentwicklung direkt steuernden Impfstoffen zu denken.

Bei Nutztieren erfährt darüber hinaus auch die Selektion auf Krankheitsresistenz eine zunehmende Bedeutung. Der Konsument verlangt nach sicheren Lebensmitteln aus einer Produktion mit minimalem Medikamenteneinsatz, frei von Zoonose-Erregern. Hieran orientiert er mehr und mehr seine Akzeptanz für Produkte tierischer Herkunft. Der Produzent hat neben der Produktion sicherer Lebensmittel das Ziel, seine ökonomischen Verluste durch Infektionskrankheiten, die in Form von Tierverlusten, Leistungsminderung, Mehrarbeit sowie Kosten für Prophylaxemaßnahmen und Therapie etwa 15 bis 20% der Gesamtkosten betragen, so gering wie möglich zu halten. Weit höher sind diejenigen Kosten, die infolge von

Seuchenausbrüchen durch die Gesellschaft aufgefangen werden müssen. Nicht zuletzt ist es aufgrund ethischer Überlegungen oberstes Gebot, Leiden und Krankheit bei Tieren zu verhindern und zu mindern.

Praktische Nutzung der Krankheitsresistenz bei Nutztieren

Erste kommerzielle Ansätze zur Berücksichtigung der Krankheitsresistenz wurden beim Geflügel etabliert. Sie richten sich gegen die aviäre Leukose und die Marek'sche-Krankheit (COLE 1968). Von herausragender Bedeutung ist auch die Nutzung von Resistenzen gegen Magen-Darm-Nematoden beim Schaf (STEAR und WAKELIN 1998). In bestimmten Regionen Australiens und Südafrikas ist Schafproduktion ohne Nutzung der genetischen Resistenz der Wirte vor dem Hintergrund massiver Resistenzen der Parasiten gegen Antiparasitika, heute kaum mehr möglich. Beim Rind wurden Selektionsprogramme zur Förderung der Mastitisresistenz etabliert (HERINGSTAD et al., 2000). Für tropische Standorte sind Resistenzen gegen Trypanosomen (MURRAY et al., 2000) und gegen Zecken (BROSSARD 1998) von hohem praktischen Wert.

Die kommerzielle Nutzung der Krankheitsresistenz beim Schwein beschränkt sich bislang auf Resistenzen gegen die durch F18-Fimbrien tragenden *E. coli*-Stämme ausgelöste Colienterotoxämie (Ödemkrankheit) (VÖGELI et al., 1997). In Canada werden außerdem kommerzielle Linien mit Erfolg auf gesteigerten Immunresponse selektiert, bei synergistischer Wirkung auf die Mastleistung (WILKIE und MALLARD 2000).

Definition der Krankheitsresistenz

Unter genetischer Krankheitsresistenz versteht man das Potential eines Tieres, einer Population oder einer Rasse, nach Kontakt mit einem spezifischen infektiösen Agens keine oder nur verminderte Folgen der entsprechenden Infektionskrankheit zu entwickeln.

Man spricht vor allem dann von Resistenz, wenn nicht nur die klinische Symptomatik, sondern die gesamte Infektion verhindert wird. Im Gegensatz dazu steht die Toleranz, bei der es zwar zur Infektion des Wirts kommt, der Erreger jedoch toleriert wird, ohne dass sich eine deutliche klinische Symptomatik einstellt (BISSET und MORRIS 1996). Im Allgemeinen werden jedoch beide Möglichkeiten unter dem Begriff der Krankheitsresistenz

zusammengefasst, wobei dann zwischen absoluter und relativer Resistenz unterschieden wird. Auch relative Resistenzen können den Grad von Infektion, Erkrankung, Ausscheidung und Erregerdichte in einer Population oder einem Tierbestand entscheidend vermindern. Die überragende Bedeutung dieses Aspekts wird klar, bedenkt man die herausragende Rolle des Infektionsdrucks bei der Entstehung der meisten Infektionskrankheiten bei Nutztieren.

Natürliche Resistenzen bei Nutztieren

Wie bereits erwähnt zeigen sich Resistenzunterschiede in oder zwischen Nutztier-Populationen für die meisten Infektionskrankheiten. Eine Übersicht mit Bezug auf Wiederkäuer und Schwein findet sich bei SIPOS et al. (2002, 2003). Eine Zusammenstellung für das Schwein wurde von REINER et al. (2003) publiziert. Ergänzend fürs Schwein müssen Resistenzunterschiede hinsichtlich des *Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus* (PRRSV; Übersicht bei LEWIS et al 2007), des Porcinen Circovirus Typ 2 (PCV2; OPRIESSNIG et al., 2006) und des Pleuropneumonie durch *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP; unveröffentlichte Ergebnisse) hinzugefügt werden.

Eine umfassende Darstellung des Kenntnisstandes würde den gesteckten Rahmen dieses Artikels allerdings bei Weitem sprengen.

Methodische Ansätze zur Identifikation von Geneffekten

Bei Nutztieren weisen eine Reihe von Merkmalen aus den Bereichen der Produktion (Mast- und Schlachtleistung), der Reproduktion, aber auch der Krankheitsresistenz eine ausgeprägte genetische Variabilität auf, die auf alle Varianten in diesen Merkmalen zugrunde liegenden Genen zurückzuführen ist. Nur selten zeigen solche Gene einen (weitgehenden) Einzelgencharakter, weitaus häufiger werden die Zielmerkmale durch einige (oligogen) oder zahlreiche Gene (polygen) bestimmt. Die Gene, die sich an der Variabilität solcher quantitativ verteilter Merkmale beteiligen, werden als QTL (quantitative trait loci) bezeichnet (HALEY und ANDERSSON 1997). Je mehr Gene sich an der Ausprägung polygener Merkmale beteiligen, desto geringer ist dabei im Durchschnitt der Einzeleffekt der QTL. Manche QTL ragen jedoch in ihrer Bedeutung deutlich über die anderen hinaus; sie können bis über 30% der phänotypischen Varianz erklären. Solche QTL gilt es zu identifizieren und zu nutzen.

Um Genorte mit Assoziation zur Krankheitsresistenz zu identifizieren und Genmarker zu erarbeiten, bedarf es einer zweistufigen Vorgehensweise. Auf der ersten Stufe müssen zunächst Kandidatengene identifiziert werden, die sich an der Variabilität der Resistenzlage gegen einen bestimmten Erreger oder eine Erregergruppe beteiligen. Aus diesen Kandidatengenen gilt es dann im zweiten Schritt mit realisierbarem Arbeits- und Zeitaufwand im Rahmen von Assoziationsstudien diejenigen herauszuarbeiten, die über die notwendige Assoziation zum Zielmerkmal verfügen und gleichzeitig einen hinreichend großen Anteil der Merkmalsvarianz erklären, damit sie auch als Genmarker in der Selektion einen Sinn machen. Alle QTL mit geringer Einzelwirkung müssen hingegen der klassischen, quantitativen Selektion vorbehalten bleiben.

Für die Identifikation von Kandidatengenen stehen im Wesentlichen drei synergistische Verfahren zur Verfügung: homolog-physiologische, funktionelle und positionelle Verfahren. Homolog-physiologische Kandidatengene ergeben sich aus der Grundlagenforschung. Alle Gene, die aufgrund ihrer Pathophysiologie in die vermuteten Abwehr- und Resistenzmechanismen eingebunden sein könnten zählen hier dazu. Typische homolog-physiologische Kandidatengene sind Rezeptoren, Cytokine, Gene des MHC und viele andere. Es sind vor allem die zahlreichen phänotypischen Studien an spezifischen knockout Mäusen, die zu einer Fülle homolog-physiologischer Kandidatengene führten (Mammalian phenotype browser: http://www.informatics.jax.org/searches/MP_form.shtml). Natürlich können nicht alle diese Kandidatengene in Assoziationsstudien geprüft werden. Außerdem ist es unwahrscheinlich, dass hier bereits alle Gene mit Assoziation zur aufzuklärenden Resistenz-Divergenz enthalten sein werden. Die homolog-physiologischen Kandidatengene helfen jedoch bei der Vorbereitung und Auswertung der positionellen und funktionellen Verfahren. Das positionelle Verfahren (QTL-Analyse) identifiziert Kandidatengene aufgrund ihrer Position auf Chromosomenbereichen mit Kopplung zum Zielmerkmal. Dabei wird meist das komplette Genom des Wirts berücksichtigt (HALEY und ANDERSSON 1997).

Funktionelle Verfahren hingegen führen zur Ableitung funktioneller Kandidatengene aus differentiell exprimierten RNA- (oder Protein-) Mustern, die meist zeitgleich und in umfangreichen Maßstäben, quasi als Transkriptom bzw. Proteom mit Hilfe von DNA- oder Protein-Chips erfasst werden (Expressionsanalyse).

QTL-Analyse: Mit Hilfe der QTL-Analyse wurden in den letzten Jahren sehr erfolgreich Chromosomenregionen mit Bedeutung für ökonomisch relevante Merkmale bei verschiedenen Nutztierspezies erarbeitet (HU und REECY 2007;

<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>). In informativen Familien wurden hierzu Marker und Kandidatengenvarianten genutzt, um Loci für die untersuchten Merkmalsausprägungen (QTL) zu kartieren (z.B. HALEY et al., 1994). Für die Untersuchungen wurden vor allem europäische und amerikanische Schweinerassen, das Europäische Wildschwein sowie die chinesische Rasse Meishan verwendet. Aufgrund der dargestellten DNA-Varianten war ersichtlich, dass europäische und asiatische Schweine sehr große genetische Distanzen aufweisen und für viele Kandidatengene verschiedene Allele tragen (GELDERMANN et al., 2003).

Die eigentliche QTL-Analyse prüft statistisch an mehr als 2000 Genorten, unter Einbeziehung aller Autosomen und des X-Chromosoms die Regression zwischen großelterlichen Allelen (Genotyp) und der Ausprägung Resistenz-gekoppelter Merkmale (z.B. Körpertemperatur [Phänotyp]). Solche Untersuchungen umfassen 100 bis mehrere hundert Versuchstiere. An der Position eines idealen QTL zeigen alle resistenten Tiere nur Allele der resistenten Founderrasse und alle empfindlichen Tiere nur Allele der empfindlichen Founderrasse, während sich mischerbige Tiere intermediär verhalten (z.B. mittlere Fiebergrade nach Infektion). Die Genotypen werden über informative Mikrosatelliten-Marker erfasst, die Phänotypen ergeben sich im standardisierten Infektionsversuch bei Gleichschaltung aller Umweltbedingungen.

Alleine beim Schwein liegen derzeit ca. 1675 QTL für über 280 Merkmale vor (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/pig.html>). Unter diesen QTL finden sich allerdings nur wenige für Merkmale der Krankheitsresistenz. Die geringe Zahl steht dabei im Zusammenhang mit bislang nur wenigen durchgeführten Experimenten zu dieser Fragestellung. Zahlreiche QTL-Experimente zu Produktions- oder Reproduktionsmerkmalen zeigen untereinander eine gute Übereinstimmung bezüglich der Position der kartierten QTL. Die meisten QTL bei Nutztieren weisen allerdings ausgeprägte Konfidenzintervalle auf, in deren Bereich mehrere hundert Gene lokalisiert sein können. Hierin liegt die Problematik der QTL-Analyse (KADARMIDEEN et al., 2006).

Dennoch haben QTL-Studien zu einer wertvollen Eingrenzung möglicher Kandidatengene geführt. Mittlerweile konnten die QTL zugrunde liegende Mutation (QTN; Quantitative Trait Nucleotide) beispielsweise beim Schwein für IGF-2 (JEON et al., 1999), Calpastatin (CIOBANU et al., 2002), sowie für verschiedene Merkmale der Fruchtbarkeit aufgeklärt werden (Übersicht: REINER et al., 2006a, b).

Im Hinblick auf die Krankheitsresistenz stellt sich die Frage, ob vor dem Hintergrund der geringen Heritabilität der Merkmale die Suche nach QTL als aussichtsreich angesehen werden kann. Auch diese Frage wird durch die QTL-Analyse mitbeantwortet, denn mit ihrer Hilfe ist es möglich festzustellen, ob die Varianz eines Resistenzmerkmals durch zahlreiche QTL mit geringen Effekten bedingt wird, oder ob sich auch herausragende QTL an der Merkmalsausprägung beteiligen, aus denen sich sinnvolle Marker für die Selektion ableiten lassen (REINER et al., 2007).

Derzeit werden zahlreiche Studien mit dem Ziel durchgeführt, Verfahren und Algorithmen zu entwickeln, um den Weg vom QTL zur ursächlichen Mutation zu verkürzen und die Entwicklung von Genmarkern zu forcieren. Es ist damit zu rechnen, dass die bis dahin vorliegenden QTL-Informationen dann einen raschen Erkenntnisgewinn generieren werden.

Expressionsanalyse: Während die QTL-Analyse den positionell genomischen Ansatz repräsentiert, zielen Microarray-gestützte Analysen differentiell exprimierter Gene als funktionelle Genomanalyse auf das Transkriptom der Versuchstiere ab. Abgesehen von den noch relativ hohen Kosten für Nutztier-spezifische DNA-Arrays stehen bereits „DNA-Chips“ mit bis über 30.000 Genen zur Verfügung. Da sich die Diversität zwischen Individuen gerade auch in der Diversität der Genexpression ausdrückt, geht von dieser Analyseform ein hohes Potential im Sinne der Fragestellung aus.

Allerdings ist der Schluss von differentiellen Expressionsmustern auf die Gene mit den verantwortlichen Varianten nicht ganz einfach, denn es ist zunächst kaum möglich zu unterscheiden, ob die differentielle Expression eines Gens auf eine Variante im Gen selbst (cis) oder auf eine Variante in einem vorgeschalteten und zunächst unbekanntem Gen (trans) beruht. Es ist also grundsätzlich möglich, dass im differentiell exprimierten Gen selbst keine Genvarianten erarbeitet werden können (DOSS et al., 2005). Außerdem führen genomweite Expressionsstudien meist zu einer unüberschaubaren Vielzahl differentiell exprimierter Kandidatengene, die aus logistischen und ökonomischen Gründen nicht alle daraufhin untersucht werden können, ob sie eine für die differierende Merkmalsausprägung mitverantwortliche Genvariante tragen (YAMASHITA et al., 2005; DOSS et al., 2005; WALKER and HUGHES 2008).

Exprimierte quantitative trait loci: Die Untersuchung exprimierter Quantitativer Trait Loci (eQTL) durch Kombination von Transcriptomics und QTL-Analyse (JANSEN und NAPP 2001) wird auch als „genetical genomics“ bezeichnet. Dabei werden die mRNA-Expressions-

Spiegel von Kandidatengenem gleichzeitig als quantitative Merkmale in der QTL-Analyse in einem segregierenden Familienmaterial (z.B. F₂-Familie) behandelt (KADARMIDEEN et al., 2006). Der Expressionsteil kann sich dabei sowohl auf das gesamte Transkriptom, als auch auf ausgewählte Kandidatengene beziehen (KADARMIDEEN et al., 2006). Ziel der eQTL-Analyse ist die redundante Bestätigung von Kandidatengenem auf funktioneller und positioneller Ebene, d.h. dass einem Gen das differentiell exprimiert wird und das zugleich als QTL im Bereich seiner (bekannten) chromosomalen Lokalisation abgebildet wird ein höherer Kandidatengenstatus zukommt (YAGUCHI et al., 2005, DRAKE et al., 2006). Erfolgreiche Beispiele liegen bei der Hefe (BREM et al., 2002), bei Nagern (SCHADT et al., 2003), beim Menschen (SCHADT et al., 2003) und beim Huhn (LIU et al., 2001) vor.

Verfahren für die Verwendung funktionswichtiger Gene in der Leistungszucht.

Es gibt bereits effiziente Verfahren, um Markerloci in der Tierzucht einsetzen zu können (Markergestützte Selektion, z.B. MEUWISSEN und VAN ARENDONK, 1992). Ein erster in Zuchtprogramme beim Schwein integrierter Genort ist das FUT1-Gen. Es ist mit einer Resistenz gegenüber Coli-F18 bedingten Durchfällen und Ödemkrankheit gekoppelt (VÖGELI et al., 1997; MEIJERINK et al., 1997). Wie sich auch QTL zukünftig in die praktische Zuchtarbeit integrieren lassen könnten ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung (z.B. DEKKERS 2004).

Eigene Untersuchungen

Das Ziel unserer eigenen Untersuchungen ist die Etablierung von Modellen zur KR beim Schwein. Dabei geht es langfristig um die Erarbeitung von Genorten und Genmarkern die für die Variabilität der Resistenz verantwortlich sind. Da genomweite Assoziationsstudien beim Schwein aufgrund der zur Verfügung stehenden Anzahl an SNPs noch nicht durchgeführt werden können, versuchen wir, Resistenzen und deren Mechanismen auf der Basis segregierender F₂-Familien abzuleiten. Die Familien werden aus Founderrassen, die sich hinsichtlich der Resistenz gegenüber dem Zielerreger möglichst deutlich unterscheiden, erstellt. In einigen der Modelluntersuchungen haben sich bislang insbesondere die Rassen Pietrain und Meishan als konvergent herausgestellt.

Zu den bearbeiteten Erregern gehören das *Pseudorabiesvirus* (Erreger der Aujeszky'schen Krankheit; REINER et al., 2002a), *Sarcocystis miescheriana* (protozoischer Muskleparasit; REINER et al., 2002b, 2007), *Salmonella typhimurium* sowie die zu den bedeutendsten Erregern respiratorischer Erkrankungen zählenden *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) und PRRSV (*Porzines Reproductive und Respiratorisches Syndrom Virus*; in Vorbereitung). Mit dem *Pseudorabiesvirus*-Modell gelang uns der weltweit erste Nachweis von QTL für die Krankheitsresistenz beim Schwein.

Resistenz gegen *Sarcocystis miescheriana*

Sarcocystis miescheriana zählt zur protozoischen Gruppe der Apicomplexa. Eine Übersicht findet sich unter REINER et al. (2002b, 2007). Hier nur das Wichtigste in Kürze. Zwischenwirt ist das Schwein, als obligatorische Endwirte treten der Hund und andere Carnivoren auf. Nach oraler Aufnahme von Oozysten durchläuft der Parasit zunächst zwei Schizogonien in Endothelzellen verschiedener Organe. Ab der fünften Woche post infectionem (p.i.) kommt es dann zur Formation von Sarcozysten in Skelett- und Herzmuskulatur. Betroffene Schweine zeigen in Abhängigkeit von der aufgenommenen Sporozystenanzahl reduzierte Leistungen, aber auch mehr oder weniger deutlich ausgeprägte klinische Bilder. Die stärkste Belastung für die Schweine entsteht zum Zeitpunkt der zweiten Schizogonie (Tage 12 bis 14 p.i.). In Folge der Zerstörung von Endothelzellen stellen sich u.a. hohes Fieber, Thrombozytopenie, Anämie und Blutgerinnungsstörungen ein. Auch Verschiebungen im Differentialblutbild werden beobachtet. Nach oraler Infektion mit 50.000 Sporozysten zeigten Schweine der Rassen Pietrain und Meishan deutliche Resistenzunterschiede. Pietrain Schweine waren dabei akut und chronisch anfälliger und entwickelten unter der chronischen Krankheitsphase eine 20fach höhere Bradyzoitenmenge pro Gramm Muskulatur. Bradyzoitenzahl und klinisches Bild zeigten eine Assoziation mit den Immunglobulin-Spiegeln. Die beobachtete phänotypische Variabilität war zum Teil hoch erblich. Dies spricht für die Beteiligung günstiger und ungünstiger Genvarianten für die Resistenz/Empfindlichkeit. Mit Hilfe einer Pietrain/Meishan F₂-Familie wurden die verantwortlichen Genorte (QTL) chromosomalen Bereichen zugeordnet. QTL mit ausgeprägter Assoziation zur Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber *S. miescheriana* konnten im Bereich des MHC und eines Immunglobulinclusters (beide auf Chromosom 7) kartiert werden. Die Ergebnisse sprechen für die direkte ursächliche Beteiligung von Genvarianten innerhalb dieser beiden Genklassen. Vor dem Hintergrund der weltweiten Verbreitung des

Parasiten und der sich daraus ergebenden ökonomischen Bedeutung könnte die Aufklärung der ursächlichen Genvarianten einen wertvollen Ansatz zum Verständnis und zur Bekämpfung der Sarkozystose darstellen. Darüber hinaus dient das vorgestellte Modell zur Verdeutlichung der Vorgehensweise und des Potentials von Resistenzstudien, auch im Hinblick auf andere Erreger-Wirts-Interaktionen.

Resistenz gegen PRRSV

Die Suche nach Resistenzen gegen PRRSV beim Schwein scheint aufgrund der ausgeprägten, weltweiten ökonomischen Relevanz des Erregers besonders geboten. Bei PRRS handelt es sich um einen der weltweit bedeutendsten Krankheitskomplexe beim Schwein. Es wird seit 1987 in Nordamerika und seit Ende der 1990er Jahre in Deutschland nachgewiesen. Das PRRS-Virus (PRRSV) gehört zur Familie der Arteriviridae der Ordnung Nidovirales. Es wurde 1991 in Lelystad/Niederlande isoliert (WENSVOORT et al., 1991) und besteht aus einem singulären, positiven mRNA-Strang (BENFIELD et al., 1992). Das Genom von 15 kb enthält 7 ORFs. PRRSV ist weltweit verbreitet und weist eine ausgeprägte Variabilität zwischen amerikanischen und europäischen (35-50 %), aber auch innerhalb dieser Subtypen (bis 20 %) auf. Diese geht ursächlich auf die bei RNA-Viren hohe Mutationsrate zurück. Unterschiede in der Antigenität und Virulenz konnten allerdings bislang weder bestimmten Genomfragmenten noch genetischen Unterschieden zwischen Isolaten zugeordnet werden.

Das Virus ist hoch ansteckend und wird hauptsächlich oronasal, und über den Geschlechtstrakt aufgenommen. Die Virusausscheidung kann über alle Sekrete und Exkrete erfolgen und über Monate nach der Infektion andauern. Persistent, intrauterin infizierte Ferkel stellen eine besonders nachhaltige Infektionsquelle dar (BENFIELD et al., 1992). Die Persistenz ist dabei vor allem mit lymphatischem Gewebe assoziiert. PRRSV wird zwischen Herden hauptsächlich durch Zukauf klinisch inapparenter Tiere übertragen, aber auch die Verbreitung über die Luft, über Sperma und Vektoren ist von Bedeutung.

Die Brennpunkte innerhalb der Betriebe liegen insbesondere im Bereich der Ferkelaufzucht und bei der Jungsaueneingliederung. Aus diesen Bereichen springt immer wieder Virus auf die Reproduktionsherde über. Hieraus entwickelt sich der typische endemische Verlauf mit wellenförmigem Auftreten klinischer Bilder.

Prophylaxe und Elimination des Erregers aus dem Bestand sind schwierig, da keine über längere Zeit belastbare Immunität auf Bestandsebene eintritt. Die notwendigen hygienischen

Maßnahmen im Betrieb sind oft nur schwer umsetzbar. In Deutschland sind daher inzwischen die Mehrzahl der Sauen haltenden Betriebe mit PRRSV durchseucht.

Die ökonomischen Verluste pro Mastschwein werden mit 6 – 12 €/je Tier beziffert. Für die USA wird ein jährlicher Schaden von 66,75 Millionen US\$ in Zuchtherden und 493,57 Millionen US\$ in Mastbeständen angegeben. Diese Verluste übersteigen selbst die der Schweinepest und der Aujeszky'schen Krankheit vor deren Eradikation.

Klinik und Sektionsbild

Das klinische Bild ist, in Abhängigkeit vom Tieralter, von Resistenzlage und Immunität, vom Virustyp und von den Sekundärerregern sehr variabel (Übersicht: ZIMMERMANN et al., 2006). PRRSV alleine verursacht Fieber. Während der Genotyp II (nordamerikanischer Prototyp) teils schwerwiegende respiratorische Erkrankungen hervorruft, verursachen Infektionen mit dem Genotyp I (europäischer Prototyp) eine geringgradige interstitielle Pneumonie, jedoch keine klinisch auffälligen respiratorischen Störungen. Bei Neuausbrüchen von PRRS in einer Region dominiert zunächst (ca. 1-4 Wochen) das reproduktive Geschehen mit Spätaborten, Umrauschen und bis zu 60 % Ferkelverlusten. Akut betroffene Tiere zeigen Inappetenz, hohes Fieber, häufig auch Konjunktivitis und Dyspnoe. Plötzliche Todesfälle bei Sauen sind möglich. Nach 1 – 3 Monaten geht dann die Inzidenz der Spätaborte zurück, während respiratorische Probleme zunehmen. Die Spätaborte sind Folge der direkten Schädigung der Plazenta, die dann die Versorgung des Foetus im geburtsnahen Intervall nicht mehr gewährleisten kann. Neonaten zeigen Ödeme, braunfleckige Lungen und Nabelblutungen. Die respiratorische Krankheitsform beider Genotypen fördert bakterielle und virale Koinfektionen und überwiegt bei endemischem Verlauf, wird aber häufig auch von gesteigerten Umrauscherquoten begleitet; hierbei dominieren Fieber, Konjunktivitis, Niesen und Dyspnoe.

Pathologisch anatomisch zeigen sich interstitielle Pneumonie und Lymphadenitis. Wie bereits für das klinische Bild beschrieben, variiert die Ausprägung der Symptomatik mit verschiedenen Faktoren des Erregers und des Wirts (ZIMMERMANN et al., 2006). Die Absicherung des klinischen oder pathologisch-anatomisch/histologischen Verdachts bedarf des Erregernachweises. Da sich Genotyp I –PRRSV meist nur in primären Alveolarmakrophagen vermehren lässt und die Empfänglichkeit und Vermehrungseffizienz dieser Zellen individuell unterschiedlich ist, sind molekularbiologische Nachweisverfahren, wie z.B. die PCR „state of the art“. Für die Herdendiagnostik werden auch serologische Verfahren erfolgreich angewandt.

Hinweise auf Resistenzen gegenüber PRRSV?

Hinweise auf mögliche genetische Unterschiede in der Empfindlichkeit/Resistenz gegenüber dem PRRSV ergeben sich aus verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien. Die vorliegenden Informationen sind allerdings bislang sehr begrenzt und inkonsistent (AIT-ALI et al., 2006; LEWIS et al., 2007). Erste Resistenzunterschiede nach PRRS-Infektion wurden von HALBUR et al. (1998) aufgezeigt: Im Vergleich zu Duroc und Pietrain zeigten Large White einen signifikant höheren Anteil PRRSV-infizierter Makrophagen nach *in-vitro* Infektion (VINCENT et al., 2005). Aus diesen Ergebnissen konnte allerdings kein klarer Zusammenhang zwischen PRRS und klinischem Bild oder Persistenz abgeleitet werden. Auch zwischen einer Nebraska-Linie und einer Hampshire-Duroc-Linie konnten geringe, aber statistisch signifikante, genetische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber PRRSV nachgewiesen werden (PETRY et al., 2005).

Im Vergleich von fünf Linien zeigten sich Vorteile der Landrasse hinsichtlich der Replikation des PRRSV in Alveolarmakrophagen *in vitro*. Der Resistenzvorteil war mit hohen TNF und IL8 Spiegeln *in vivo* in der frühen Infektionsphase verknüpft.

PRRS-Resistenz - eigene Ergebnisse

In einem gemeinsam mit bioscreen, Münster durchgeführten Versuch (in Vorbereitung), konnten wir hochsignifikante genetische Unterschiede in der Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber PRRSV beim Schwein nachweisen. Miniatur- und Pietrain-Schweine zeigten nach intramuskulärer Applikation eines attenuierten PRRS-Lebendvirus (Impfvirus Ingelvac PRRS MLV, Boehringer Ingelheim) ausgeprägte Unterschiede in der Virusreplikation und damit dem Ausmaß und der Dauer der Virämie. Eine detaillierte klinische und virologische Studie der Tiere im Zeitraum von 7 Tagen ante bis 43 Tage post inoculationem führte zu dem Ergebnis, dass bei den Miniaturschweinen, nicht jedoch bei Pietrain die Virämie ab Tag 28 p.i. beendet war. Die Titration des Virusgehaltes unter der Virämie zeigte darüber hinaus, dass die Miniaturschweine nur 3% des Virustiters der Pietrain-Schweine entwickelten. Diese Ergebnisse stellen einen hervorragenden Ausgangspunkt für die Untersuchung der basalen molekularen Mechanismen der PRRSV-Resistenz dar.

APP-Resistenz

Aufbauend auf ähnlich erfolgreichen Vorversuchen mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* sind wir im Rahmen des vom BMBF geförderten FUGATO-plus Projekts "RePoRI" an der Entschlüsselung der Resistenz/Empfindlichkeit von Schweinen gegen diesen sehr bedeutsamen bakteriellen Erreger von Atemwegserkrankungen beteiligt. Der Forschungsansatz integriert, wie eingangs beschrieben, homolog-physiologische, positionelle und funktionelle Methoden.

Fazit

Die verschiedenen Rassen und Populationen landwirtschaftlicher Nutztiere verfügen über eine ausgeprägte genetische Variabilität und über erhebliche Unterschiede hinsichtlich Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber Infektionskrankheiten. Außerdem weisen sie eine metabolische Übereinstimmung mit dem Menschen auf, die teilweise deutlich über die klassischer Labortiere hinausgeht. Die genetischen Basisinformationen (Verfügbarkeit von Sequenz- und Genmarker-Information), schreitet rasch voran. Auch die methodischen und praktischen Anforderungen (z.B. Erstellung segregierender Populationen durch Kreuzung) für die Durchführung vergleichender Studien zur genetischen Krankheitsresistenz, werden erfüllt. Die Liberalisierung des Welthandels sowie wachsende Anforderungen des Verbrauchers und der Gesellschaft an die Qualität der tierischen Produktion führen gleichzeitig zu einem strategischen Tiergesundheitsmanagement mit Garantien für das Freisein von Krankheiten, Erregern und Rückständen. Die Basis solcher Garantien liegt in der Reduktion von Erregern im Umfeld der Gesamtproduktion durch produktionstechnische und hygienische Maßnahmen. Je ausgeprägter die natürliche Resistenz gegenüber einem Erreger oder einer Erregergruppe, desto geringer sind Infektionsgefahr, Erregerausscheidung und Therapiebedarf und desto garantiefähiger wird die Produktion.

Beim Nutztier liegen eine ganze Reihe wertvoller und vielversprechender Krankheitsmodelle vor. Zunächst ist es ein weiter Weg vom Krankheitsmodell bis hin zur Aufklärung der zugrundeliegenden, molekularen Pathogenesemechanismen und zur Entwicklung praxisreifer Genmarker. Doch die notwendigen Techniken stehen mit funktionellen und positionellen Verfahren der Genomanalyse und deren Kombinationen zur Verfügung. Beispiele bei verschiedenen Nutztierspezies, auch eigener Untersuchungen, belegen die Existenz von

Einzelgenvarianten mit herausragender Bedeutung für die Krankheitsresistenz und zeigen den Weg hin zu deren molekularer Entschlüsselung, zum Wohl der Tiere und des Menschen.

Literatur

- AIT-ALI, T., WILSON, A.D., WESCOTT, D., CLAPPERTON, M., MELLENCAMP, M.A., DREW, T.W., BISHOP, S.C., ARCHIBALD, A.L., (2006):** Innate immune response to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated porcine alveolar macrophages. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, Vol.1, p58.
- BENFIELD, D.A., NELSON, E., COLLINS, J.E., HARRIS, L., GOYAL, S.M., ROBINSON, D., CHRISTIANSON, W.T., MORRISON, R.B., GORYCA, D., CHLADEK, D. (1992):** Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J. Vet. Diagn. Invest. 4, 127-133.
- BISSET, S.A., MORRIS, C.A. (1996):** Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode challenge. Int. J. Parasitol. 26, 857-868.
- BREM, R.B., YVERT, G., CLINTO, R., KRUGLYAK, L. (2002):** Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. Science **296**, 752-755.
- BROSSARD, M. (1998):** The use of vaccines and genetically resistant animals in tick control. In: Genetic resistance to animal diseases. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. **17**, 188-199.
- CIOBANU, D.C., LONERGAN, S.M., BASTIAANSEN, J.W.M., WOODLAND, J.R., MALEK, M., HUFF-LONERGAN, E.J., PLASTOW, G.S., ROTHSCILD, M.F. (2002):** Evidence for new alleles in calpastatin gene associated with meat quality traits in pigs. Proceed. 7th world congress on genetics applied to livestock production, Montpellier, France, 10-11.
- COLE, R.K. (1968):** Studies on genetic resistance to Marek's disease. Avian Dis. **12**, 9-28.
- DEKKERS, J.C. (2004):** Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. J. Anim. Sci. **82 E-Suppl**, E313-328.
- DOSS, S., SCHADT, E.E., DRAKE, T.A., LUSIS, A.J. (2005):** Cis-acting expression quantitative trait loci in mice. Genome Res. **15**, 681-691.
- DRAKE, T.A., SCHADT, E.E., LUSIS, A.J. (2006):** Integrating genetic and gene expression data: application to cardiovascular and metabolic traits in mice. Mamm. Genome **17**, 466-479.

- GELDERMANN, H., MÜLLER, E., MOSER, G., REINER, G., BARTENSCHLAGER, H., CEPICA, S., STRATIL, A., KURL, J., MORAN, C., DAVOLI, R., BRUNSCH, C. (2003):** Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Pietrain, Meishan and Wild Boar crosses. *J. Anim. Breed. Genet.* **120**, 363-393.
- HALBUR, P., ROTHSCHILD, M.F., THACKER, B. (1998):** Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire and Meishan pigs to infection with a high-virulence strain (VR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS). *J. Anim. Breed. Genet.* **115**, 181-189.
- HALEY, C.S., ANDERSSON, L. (1997):** Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals. In: *Genome Mapping*. Dear PH, ed. Oxford, New York, Tokyo: IRL Press, pp. 49-71.
- HALEY, C.S., KNOTT, S.A., ELSEN, J.M. (1994):** Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* **136**, 1195-1207.
- HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., RUANE, J. (2000):** Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the nordic countries. *Livestock Prod. Sci.* **64**, 95-106.
- HU, Z.L., REECY, J.M. (2007):** Animal **QTLdb**: beyond a repository. A public platform for QTL comparisons and integration with diverse types of structural genomic information. *Mamm. Genome* **18**, 1-4.
- JANSEN, R.C., NAPP, J.P. (2001):** Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet.* **17**, 388-391.
- KADARMIDEEN, H., VON ROHR, P., JANSS, L.L.G. (2006):** From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. *Mamm. Genome* **17**, 548-564.
- LEWIS, C.R.G., AIT-ALI, T., CLAPPERTON, M., ARCHIBALD, A.L., BISHOP, S. (2007):** Genetic perspectives on host responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). *Viral Immunol.* **20**, 343-357.
- LIU, H., CHENG, H.H., TIRUNAGARU, V., SOFER, L., BURNSIDE, J. (2001):** A strategy to identify positional candidate genes conferring Marek's disease resistance by integrating DNA microarrays and genetic mapping. *Anim. Genet.* **32**, 351-359.
- MEIJERINK, E., FRIES, R., VÖGELI, P., MASABANDRA, J., WIGGER, G., STRICKER, C., NEUENSCHWANDER, S., BERTSCHINGER, H.U., STRANZINGER, G. (1997):** Two alpha(1,2) fucosyltransferase genes on porcine

- chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor S and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. *Mamm. Genome* **8**, 736-741.
- MEUWISSEN, T.H., VAN ARENDONK, J.A. (1992):** Potential improvements in rate of genetic gain from marker-assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *J. Dairy Sci.* **75**,1651-1659.
- MURRAY, M., STEAR, M.J., TRAIL, J.C.M., D'ITERAN, G.D., AGYEMANG, K., DWINGER, R.H. (2000):** Trypanosomiasis in cattle. Prospects for control. In: Axford RFE, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB. *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. Wallingford: CABI, pp. 203-223.
- N.N. (1998):** Genetic resistance to animal diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **17**.
- OPRIESSNIG, T., FENAUX, M., THOMAS, M., HOOGLAND, M.J., ROTHSCCHILD, M.F., MENG, X.J., HALBUR, P.G. (2006):** Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to Porcine Circovirus Type-2-associated disease and lesions. *Vet. Pathol.* **43**, 281-293.
- REINER, G. (2003):** Evaluierung und Nutzung der natürlichen Krankheitsresistenz beim Schwein - aktueller Stand und Möglichkeiten. *Tierärztl. Prax.* **31 (G)**, 151-157.
- REINER, G. (2006a):** Genetische Aspekte der Fruchtbarkeit beim Schwein. *Tierärztl. Prax.* **34(G)**, 171-178.
- REINER, G. (2006b):** Produktqualität und Genomanalyse in der Schweineproduktion - eine Übersicht. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **113**, 41-80.
- REINER, G., ECKERT, J., PEISCHL, T., BOCHERT, S., JÄKEL, T., MACKENSTEDT, U., JOACHIM, A., DAUGSCHIES, A., GELDERMANN, H. (2002b):** Variation in clinical and parasitological traits in Pietrain and Meishan pigs infected with *Sarcocystis miescheriana*. *Vet. Parasitol.* **106**, 99-113.
- REINER, G., MELCHINGER, E., KRAMAROVA, M., PFAFF, E., BÜTTNER, M., SAALMÜLLER, A., GELDERMANN, H. (2002a):** Detection of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to pseudorabies virus in swine. *J. Gen. Virol.* **83**, 167-172.
- REINER, G., WILLEMS, H., BERGE, T., FISCHER, R., KÖHLER, F., HEPP, S., HERTRAMPF, B., KLIEMT, D., DAUGSCHIES, A., GELDERMANN, H., MACKENSTEDT, U., ZAHNER, H. (2007):** Mapping of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to *Sarcocystis miescheriana* in swine. *Genomics* **89**, 638-646.
- SCHADT, E.E., MONKS, S.A., DRAKE, T.A., LUSIS, A.J., CHE, N. (2003):** Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature* **422**, 297-302.

- SIPOS, W., SCHMOLL, F., WIMMERS, K. (2002):** Selektion beim domestizierten Wiederkäuer und Schwein auf Krankheits- und Seuchenresistenz mit Hilfe von Indikatormerkmalen, Marker- und Kausalgenen - ein Überblick. 1. Mitteilung: Kurze Einführung in die Immungenetik der MHC- und Nicht-MHC-Gene und spezielle Immungenetik bei Rind und Schwein. Dtsch. tierärztl. Wschr. **109**, 461-500.
- SIPOS, W., SCHMOLL, F., WIMMERS, K. (2002):** Selektion beim domestizierten Wiederkäuer und Schwein auf Krankheits- und Seuchenresistenz mit Hilfe von Indikatormerkmalen, Marker- und Kausalgenen - ein Überblick. 2. Mitteilung: Spezielle Immungenetik bei Schaf und Ziege unter besonderer Berücksichtigung der Endoparasitosen, Scrapie, Moderhinke und der Maedi-Visna-Virusinfektion. Dtsch. tierärztl. Wschr. **110**, 1-40.
- STEAR, M.J., WAKELIN, D. (1998):** Genetic resistance to parasitic infection. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. **17**, 143-153.
- VINCENT, A.L., THACKER, B.J., HALBUR, P.G., ROTHSCILD, M.F., THACKER, E.L. (2006):** An investigation of susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus between two genetically diverse commercial lines of pigs. J. Anim. Sci. **84**, 49-57.
- VÖGELI, P., MEIJERINK, E., FRIES, R., NEUENSCHWANDER, S., VORLANDER, N., STRANZINGER, G., BERTSCHINGER, H.U. (1997):** A molecular test for the detection of *E. coli* F18 receptors: a breakthrough in the struggle against edema disease and post-weaning diarrhea. Schweizer Arch. Tierheilk. **139**, 479-484.
- WALKER, M.S., HUGHES, T.A. (2008):** Messenger RNA expression profiling using DNA microarray technology: Diagnostic tool, scientific analysis or un-interpretable data? (Review). Int. J. Mol. Med. **21**, 13-17.
- WENSVOORT, G., TERPSTRA, C., POL, J.M.A., TER LAAK, E.A., BLOEMRAD, M., DE KLUYVERT, E.P., KRAGTEN, C., VAN BUITEN, L., DEN BESTEN, A., WAGENAAR, F., BROEKHUIJSEN, J.M., MOONEN, P.L.J.M., ZETSTRA, T., DE BOER, E.A., TIBBEN, H.J., DE JONG, M.F., VANT VELD, P., GROENLAND, G.J.R., VAN GENNEP, J.A., VOETS, M.T.J., VERHEIJDEN, J.H.M., BRAAMSKAMP, J. (1991):** Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Q. **13**, 121-130.
- WILKIE, B.N., MALLARD, B. (2000):** Genetic aspects of health and disease in pigs. In: Breeding for Disease resistance in farm animals. Axford RFE, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB, eds. Wallingford: CABI, pp. 379-396.

- YAGUCHI, H., TOGAWA, K., MORITANI, M., ITAKURA, M. (2005):** Identification of candidate genes in the type 2 diabetes modifier locus using expression QTL. *Genomics* **85**, 591-599.
- YAMASHITA, S., WAKAZONO, K., NOMOTO, T., TSUJINO, Y., KURAMOTO, T., USHIJIMA, T. (2005):** Expression quantitative trait loci analysis of 13 genes in the rat prostate. *Genetics* **171**, 1231-1238.
- ZIMMERMANN, J., BENFIELD, D.A., MURTAUGH, M.P., OSORIO, F., STEVENSON, G.W., TORREMORELL, M. (2006):** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (Porcine Arterivirus). In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds.), *Diseases of swine*, 9th edition, Blackwell publishing, pp.